F 1330

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 10

1967

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 10, nr 1, p. 1—90, Bucureşti, februarie 1967

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁRES DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 48 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134—135, Bucureşti, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

ADRESA REDACŢIEI:

Bucureşti, *Str. Docenţilor nr. 20,*

Raionul 30 Decembrie

F 1330

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 10 (1967) Nr. 1

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Unele perspective ale investigaţiilor cantitative în cadrul teoriei moleculare a memoriei (notă preliminară) 3

A. CSONTOS, Acţiunea sulfatului feros asupra activităţii catalazei sanguine 5

GH. FURNICĂ şi C. TEODORESCU, Contribuţii la studiul modificării proprietăţilor electroforetice ale proteinelor sub acţiunea radiaţiilor ionizante şi prin complexare chimică 13

V. GHEŢIE, C. MEDEŞAN şi N. ŞT. GHIŞIU, Distribuţia şi modificarea antigenicităţii albuminei umane fluorescente, reţinută în organele, celulele şi umorile unor animale de experienţă 19

P. IONESCU, Evoluţia conţinutului în acizi tartric şi malic al strugurilor în timpul creşterii şi maturării 31

EUG. PĂUNESCU, Cercetări privind valoarea unor teste biochimice pentru obiectivarea sindromului de oboseală la foştii bolnavi de tuberculoză reîncadraţi în muncă 35

M. SIBI, F. ŞERBAN, A. BUSUIOC, D. CERNĂTESCU şi I. COLEA, Contribuţii la metodica determinării glicoproteinelor 47

REFERATE GENERALE

E. CRISTEA, Mecanismul fosforilării oxidative. 53

M. ŞERBAN, Proteinele cerebrale. 69

RECENZII 83

St. cerc. biochimie, tomul 10. nr. 1, p. 1 — 90. Bucureşti, februarie 1967

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 1, 3–4 (1967)

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR DOKUMENTÁCIÓS OSZTÁLYA BUDAPEST 1883

UNELE PERSPECTIVE ALE INVESTIGAȚIILOR CANTITATIVE ÎN CADRUL TEORIEI MOLECULARE A MEMORIEI (NOTĂ PRELIMINARĂ)

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

616.6

Rezumat. — În completarea lucrării anterioare privind teoria moleculară a memoriei, se arată posibilitățile unor investigații de ordin cantitativ. Acestea se referă la viteza de propagare a impulsurilor nervoase de înregistrare, la relațiile dintre viteza de propagare și posibilitățile de deplasare a electronilor π în sistemele bazelor heterociclice și la legăturile dintre structura chimică a diferitelor substanțe și efectele lor asupra comportării mnezice a sistemului nervos central.

Imediat după apariția lucrării *Premise ale unei teorii moleculare a memoriei* [1] s-a pus întrebarea dacă această teorie deschide posibilitatea unor investigații de ordin cantitativ în domeniul menționat. De aceea, vom schița unele perspective de acest gen, urmînd ca lucrările să fie publicate pe măsura încheierii cercetărilor și calculelor respective.

Una din probleme ar fi viteza de propagare a impulsurilor nervoase de înregistrare. Conform teoriei, aceste impulsuri sînt generate de anumite formațiuni nervoase, se propagă de-a lungul dispozitivelor neuropurtătoare, răspund prin modulații sincrone ale parametrilor lor la oscilațiile (impulsurile) senzoriale, acționează asupra componentelor polifosfolipidice ale dispozitivului neuropurtător și provoacă la nivelul acestora acele deformări nereversibile prin care se realizează înregistrarea codificată a informației senzoriale și transformarea dispozitivului neuropurtător în sensogramă.

În principiu, viteza de propagare a impulsurilor de înregistrare poate fi estimată dacă se ține seama, între altele, de puterea impulsurilor nervoase care intră în joc, de inerția la deformare a sistemelor polifosfolipidice din dispozitivele neuropurtătoare, de durata minimă de acțiune pe care impulsurile de înregistrare trebuie s-o exercite asupra sistemelor polifosfolipidice menționate și de distanțele dintre componentele formațiunilor polifosfolipidice ale dispozitivului neuropurtător de-a lungul căruia se propagă impulsurile de înregistrare. Cum, în cazul înregistrărilor acustice și optice, viteza relativă de deplasare a dispozitivului purtător, în raport cu dispozitivul înregistrator, este extrem de mică în comparație cu viteza de propagare a oscilațiilor sonore, respectiv luminoase, tot așa este probabil că și în cazul înregistrării mnezice viteza de propagare a impulsurilor de înregistrare (dispozitivul neuroînregistrator), în raport cu dispozitivul neuropurtător, este incomparabil mai

mică decît viteza de propagare a oscilațiilor (impulsurilor) senzoriale obișnuite.

Se mai pune problema relațiilor dintre viteza de propagare a impulsurilor nervoase de înregistrare și posibilitățile de deplasare a electronilor π din sistemul bazelor heterociclice ale componentelor nucleice din dispozitivul neuropurtător. Aceasta cu atît mai mult cu cît tocmai aceste componente nucleice par să joace un rol însemnat în conducerea și dirijarea impulsurilor de înregistrare de-a lungul dispozitivului neuropurtător.

Tot aici se încadrează problema dimensiunilor și mai ales a lungimii sensogramelor, ultimul aspect putînd fi estimat pe baza vitezei de propagare a impulsurilor nervoase de înregistrare și a duratei maxime a vieții omului. Ar fi interesant de stabilit raporturile dintre lungimea totală a sensogramelor și numărul celulelor nervoase din regiunile creierului cu activitate mnezică.

În fine, printre problemele pe care le pune teoria moleculară a memoriei, mai poate fi menționată și aceea a legăturilor dintre structura chimică a diferitelor substanțe și efectele lor asupra comportării mnezice a sistemului nervos central văzută prin prisma deformărilor structurale pe care le pot produce la nivelul sistemelor de componente ale dispozitivelor aparatului mnezic. În special par interesante legăturile dintre încărcătura electrică a cationilor de alcaloizi și producerea de deformări la rețelele polifosfolipidice transmițătoare ale oscilațiilor (impulsurilor) senzoriale, sesizabile prin apariția iluziilor.

În momentul de față, unele aspecte ale problemelor menționate sînt accesibile rezolvării principiale pe baza unor ipoteze ajutătoare și promit să permită stabilirea unor reacții cantitative între diferiți factori care intră în joc, chiar dacă nu vor duce imediat la date cifrice precise. Alte aspecte necesită cercetări prealabile pe modele fizico-chimice și apoi pe animale, pentru ca, prin analogie și cu rezervele cuvenite, să permită tragerea unor concluzii valabile. Astfel, premisele unei teorii moleculare a memoriei, enunțate în lucrarea precedentă, deschid unele posibilități de investigație de ordin cantitativ în domeniul activității noastre mnezice.

Prezentat la redacție la 28 septembrie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
și
Catedra de biochimie a Facultății de biologie a Universității București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Premise ale unei teorii moleculare a memoriei*, St. cerc. biochim., **9**, 231 (1966)
Living matter and premises of a molecular theory of memory, Rev. roum. biochim. **3**, 249 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 1, 5–12 (1967)

ACȚIUNEA SULFATULUI FEROS ASUPRA ACTIVITĂȚII CATALAZEI SANGUINE

A. CSONTOS

612.398.12

Rezumat. — *In vitro*, fierul în anumite concentrații inhibă activitatea catalazei sanguine. Sulfatul feros aplicat la șobolani în doze mici stimulează, iar în doze masive inhibă activitatea catalazei sanguine.

Tratamentul îndelungat cu tonofer, asociat cu vitamine, la bolnavi cu anemie feriprivă stimulează activitatea enzimei. În boala canceroasă, fierul bivalent provoacă o scădere foarte semnificativă în activitatea catalazei sanguine.

Determinarea activității catalazei sanguine în cursul feroterapiei poate să dea indicii pentru o interpretare mai justă a eficacității tratamentului aplicat.

Catalizatorii celulari cu fier formează puntea dintre celulă și mediu înconjurător în procesul de respirație tisulară [17], funcție care în mare parte este realizată de atomul de fier prin cedarea și acceptarea unui electron [18].

Despre catalaza sanguină se știe că conține în structura ei hemina în proporții similare cu ale hemoglobinei [4], [5]. Complexul de metal-enzimă realizează, pe de o parte, stabilirea stării de valență a metalului, iar pe de altă parte modifică încărcarea electronică și configurația proteinei [19].

Problemele legate de fiziologia catalazei sanguine încă nu sînt complet elucidate. Abderhalden [1] afirmă pentru prima dată că activitatea enzimelor poate să fie influențată de introducerea în organism a substanțelor care joacă un rol important în structura lor. Bingold [5], Bach-Zubkova (citat după [14]), Takahara [20] atrag, printre altele, atenția asupra faptului că în anemia hipocromă activitatea este scăzută.

Feroterapia orală, care a fost aplicată la anemici din cele mai vechi timpuri ne permite deci să urmărim acțiunea fierului și asupra activității catalazei sanguine. Progresele din ultimele decenii cu privire la cunoașterea metabolismului fierului au adus multe lămuriri și asupra eficacității acestui tratament [12], [17]. Astăzi se admite ca indicație pentru feroterapie corectarea tulburărilor date de scăderea fierului heminic și asigurarea rezervelor de fier.

În literatura de specialitate nu am găsit date care să demonstreze acțiunea sulfatului feros asupra activității catalazei sanguine. Pe baza celor expuse și în lumina concepțiilor noi [15] despre raportul dintre

medicamente și enzime, în lucrarea de față am urmărit acțiunea sulfatului feros asupra activității catalazei sanguine, și anume :

I. Am studiat *in vitro* acțiunea sulfatului feros asupra activității enzimei.

II. Într-o primă parte a experiențelor efectuate *in vivo* am urmărit acțiunea fierului bivalent asupra activității catalazei la șobolani, după care variațiile activității enzimatice au fost înregistrate și pe oameni :

a) prin aplicarea unei doze unice de fier (provocare)și

b) în cursul tratamentului îndelungat cu tonofer asociat cu vitamine.

METODA DE LUCRU

Analizele *in vitro* au cuprins un număr de 100 de experiențe, dintre care în 50 de cazuri am studiat efectul propriu-zis catalitic al fierului asupra apei oxigenate. Cantități crescînde de sulfat feros (Merck), cuprinse între 0,025 și 8 mg, au fost puse în contact cu o cantitate constantă de peroxid de hidrogen (13,6 mg), iar după 30 min la 37°C, s-a determinat cantitatea apei oxigenate descompusă de către fier. În alte 50 de analize s-a urmărit acțiunea fierului bivalent asupra activității enzimei. La 1 ml de sînge recoltat de la persoane tinere și sănătoase s-a adăugat de asemenea fier în cantități crescînde (0,025—8 mg). După 10 min de incubație la 37°C s-a pipetat în eprubete peroxid de hidrogen. Reacția a decurs la aceeași temperatură (pH 7,2—7,4) timp de 30 min, după care cantitatea apei oxigenate rămasă nedescompusă a fost titrată în mediu acid cu permanganat de potasiu 0,1 N.

Experiențe efectuate pe șobolani. Cu caracter preliminar s-a determinat activitatea catalazei sanguine pe un număr de 50 de șobolani, pentru a se obține valorile nominale. Experiențele propriu-zise au fost efectuate pe un număr de 75 de șobolani tineri, albi, masculi, cu greutate corporală între 150 și 200 g, din care 50 de animale au fost tratate zilnic cu fier în felul următor : la 25 de șobolani, s-au introdus prin sondă 0,5 mg, iar la 25 de animale 5 mg fier zilnic timp de 4 săptămîni. Lotul martor (25 de șobolani) a fost ținut și hrănit în condiții similare cu acelea ale loturilor tratate. Activitatea catalazei a fost determinată, inițial și apoi în cursul experienței, săptămînal.

Experiențe pe oameni. După recoltarea sîngelui pentru determinarea activității enzimatice și a sideremiei inițiale, persoana examinată a primit, *à jeun*, 2 g de sulfat feros dizolvat în 50 ml de apă. Examenele de control au fost făcute la 2 și 4 ore după ingerarea fierului. Din cele 58 de persoane la care s-a efectuat această provocare cu fier, 20 sufereau de anemie feriprivă, iar 15 de cancer. Lotul martor a fost alcătuit din 15 persoane tinere și sănătoase (voluntari). Sideremia a fost dozată prin metoda Heilmeyer [13]. Tratamentul cu tonofer asociat cu vitamine [11], în cura îndelungată, a fost prescris după următoarea formulă : în primele 2—3 zile, cei tratați au primit 3 drajeuri tonofer (G.I.F.), mărindu-se apoi dozele treptat pînă la 3×2 buc./zi. Ca tratament adjuvant s-a administrat celor tratați 3×1 vitamină C (200 mg) și 3×2 vitamină B-complex (100 mg). Durata tratamentului în general a fost fixată la 4 săptămîni. Cele 58 de persoane tratate cu fier au fost repartizate în următoarele grupe :

a) 29 de cazuri cu anemie feriprivă instalată în urma unei hemoragii mai abundente ;

b) 29 de bolnavi cu anemie secundară (boală canceroasă, hepatită cronică). Activitatea enzimatică a fost determinată, înainte și în cursul celor 4 săptămîni de tratament, săptămînal.

Activitatea catalazei sanguine a fost determinată, după Bach-Zubkova (citat după [14] [18]), printr-o metodă modificată [6], [7].

Indexul catalazic s-a calculat după formula :

$$\text{Indexul catalazic} = \frac{\text{activitatea catalazei (în mg)}}{\text{nr. hematiilor (în milioane)}}$$

REZULTATE

În urma analizelor efectuate *in vitro* s-au obţinut rezultatele prezentate în figura 1. În condiţiile noastre experimentale, acţiunea catalitică a fierului bivalent se evidenţiază începînd cu 0,1 mg de sulfat feros. De la această doză înainte, descompunerea apei oxigenate creşte aproape

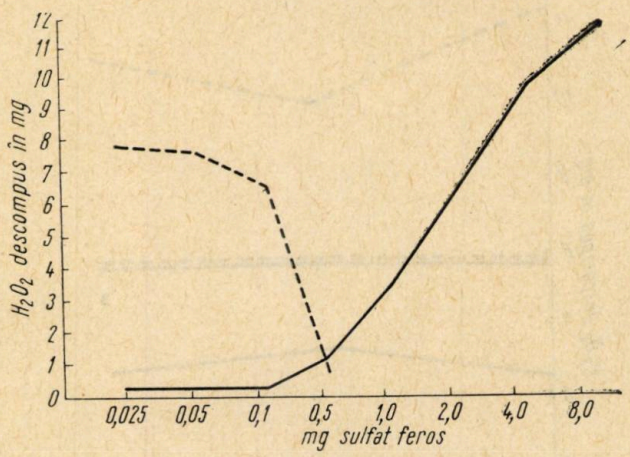


Fig. 1. — Acţiunea fierului bivalent *in vitro* asupra catalazei sanguine.

———— H_2O_2 + Fe^{++}
– – – – – – sînge + Fe^{++}

liniar cu cantitatea de fier adăugată în sistemul de reacţie. În urma combinării fierului cu enzima se observă că după depăşirea cantităţii de 0,1 mg de fier, se instalează o inhibiţie enzimatică, care la 0,5 mg este aproape completă. Activitatea catalazei sanguine determinată *in vivo*, conform metodei indicate mai sus, are următoarele valori normale :

— la şobolani tineri şi sănătoşi (greutatea corporală 150—200 g) catalaza descompune 2,40 $\pm$ 0,25 mg de apă oxigenată ;

— la persoane tinere şi sănătoase, activitatea catalazei este de 7,50 $\pm$ $\pm$ 0,35 mg de peroxid de hidrogen.

Indexul catalazic are următoarele valori : la şobolani, 0,2—0,4 ; la oameni, 1,6—2,0.

Administrarea îndelungată a sulfatului feros la şobolani duce la modificări în activitatea catalazei sanguine conform datelor prezentate în tabela 1.

Din aceste date reiese că 0,5 mg de fier/zi stimulează în mod foarte semnificativ activitatea catalazei. La dozele zilnice de 5 mg de fier se evidenţiază de asemenea această perioadă de activare, după care activitatea catalazei scade în mod foarte semnificativ spre sfîrşitul ciclului experimental.

Figura 2 înregistrează modificările activității catalazice în urma provocărilor efectuate cu fier bivalent la oameni.

Valorile sideremiei, înregistrate în raport cu această provocare sînt prezentate în tabela 2.

Tratamentul îndelungat cu tonofer asociat cu vitamine influențează activitatea enzimei, după cum arată datele prezentate în tabela 3.

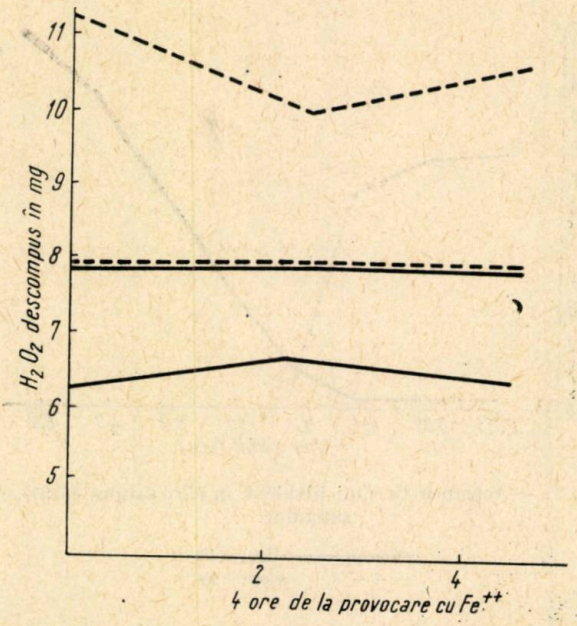


Fig. 2. — Modificarea activității catalazei sanguine după administrarea de 2 g de sulfat feros.

Sănătoși (martori)
Anemie feriprivă
Boală canceroasă

Din aceste date se remarcă o deosebire în ce privește reacția organismului la acest tratament, în funcție de natura anemiei. În anemiile feriprive, după administrarea sulfatului feros indexul catalazic crește treptat pînă la valoarea normală, pe cînd la indivizii canceroși feroterapia orală provoacă o scădere foarte semnificativă a activității enzimatice.

DISCUȚII

Calea de sinteză a catalazei sanguine fiind similară cu cea a hemoglobinei, era de așteptat ca, paralel cu stimularea hemoglobinogenezei, fierul să influențeze și activitatea catalazei sanguine.

Anemia feriprivă este caracterizată prin epuizarea rezervelor de fier și prin scăderea fierului din proteinele heminice. În consecință, în anemia feriprivă este scăzută și activitatea catalazei, fapt care de altfel

Tabela 1

Acțiunea fierului bivalent asupra activității catalazei sanguine la șobolani

Durata experienței	Apa oxigenată descompusă de catalază în mg la șobolani tratați și netratați cu fier								
	0,5 mg Fe			5 mg Fe			Martori		
	M*	D**	P***	M	D	P	M	D	P
Valoarea inițială	2,40	0,05	—	2,45	0,05	—	2,40	0,05	—
1 săptămînă	2,85	0,05	0,001	2,75	0,05	0,001	2,45	0,05	0,3—0,4
2 săptămîni	2,80	0,07	0,001	2,35	0,02	0,01—0,02	2,42	0,05	0,6—0,7
3 săptămîni	2,65	0,05	0,001	2,05	0,02	0,001	2,45	0,07	0,4—0,5
4 săptămîni	2,60	0,02	0,001	1,75	0,05	0,001	2,40	0,05	1,0

* M = media valorilor calculate (în mg)
** D = deviația standard a mediei
*** P = probabilitatea de transgresiune.

Tabela 2

Modificarea sideremiei în raport cu provocarea efectuată cu 2 mg de sulfat feros la om

Diagnostic	Sideremia (valoarea inițială)		Sideremia după provocare cu fier (8%)					
			la 2 ore			la 4 ore		
	M* (γ%)	D	M	D	P	M	D	P
Sănătoși (martori)	80	12	250	25	0,001	270	20	0,001
Anemie feriprivă	55	10	112	15	0,001	280	20	0,001
Boală canceroasă	155	25	355	20	0,001	400	35	0,001

* Aceeași legendă ca la tabela 1

Tabela 3

Modificarea indexului catalazic în cursul feroterapiei

Durata experienței	Valoarea indexului catalazic în raport cu grupa de îmbolnăvire								
	Anemie feriprivă			Cancer			Hepatită epidemică		
	M*	D**	P***	M	D	P	M	D	P
Valoarea inițială	1,30	0,02	—	2,40	0,02	—	1,70	0,05	—
1 săptămînă	1,42	0,02	0,001	2,30	0,03	0,001	1,75	0,05	0,3 —0,4
2 săptămîni	1,55	0,05	0,001	1,90	0,05	0,001	1,81	0,05	0,05—0,1
3 săptămîni	1,65	0,04	0,001	1,60	0,05	0,001	1,75	0,03	0,1 —0,2
4 săptămîni	1,70	0,05	0,001	1,40	0,06	0,001	1,80	0,04	0,02—0,05

* M = media indexului catalazic
** D = deviația standard a mediei
*** P = probabilitatea de transgresiune

a fost demonstrat şi de noi. În anemia feriprivă, aportul de fier duce la o creştere promptă în valoarea hemoglobinei, sistemul hematopoietic este activat şi dispar simptomele înregistrate înainte de tratament. Este de remarcat că în cursul administrării sulfatului feros activitatea catalazei sanguine creşte semnificativ (chiar după 3 zile), precedînd astfel modificările hematologice. Legat de această observaţie, am presupus că fierul, înainte de a fi înglobat în molecula catalazei, stimulează pe cale directă sau indirectă activitatea enzimei. Această stimulare a activităţii de către fierul bivalent a fost demonstrată şi la administrarea unei doze unice mai masive de fier, cînd la cei cu anemie feriprivă activitatea catalazei creşte chiar după 2 ore de la ingerarea fierului.

Tratamentul cu tonofer şi vitamine, aplicat în anemia feriprivă, s-a dovedit complet eficace. Activitatea catalazei creşte treptat, iar în a 4-a săptămînă atinge valoarea normală.

În anemiile hipocrome bazate pe tulburări ale metabolismului fierului, nu ne-am aşteptat la ameliorarea hemogramei şi a simptomelor generale, ci mai mult am vrut să urmărim efectul fierului bivalent asupra activităţii catalazei sanguine. Aportul de fier duce la o scădere a activităţii enzimatice, inhibiţia fiind cea mai pronunţată în boala canceroasă. După cum am mai arătat [7], [9], activitatea catalazei în boala canceroasă creşte foarte semnificativ, începînd chiar cu faza iniţială a bolii. Această hiperactivitate enzimatică a fost interpretată de noi ca o acţiune nespecifică a organismului faţă de deficienţele funcţionale instalate la nivelul proceselor oxide-reducătoare tisulare [10]. Inhibiţia enzimatică realizată de fierul bivalent în boala canceroasă poate să fie interpretată ca o acţiune directă a fierului faţă de enzimă. De altfel, inhibarea activităţii catalazice de către fierul bivalent a fost demonstrată direct prin experienţe efectuate *in vitro*. Sulfatul feros la o anumită concentraţie realizează o scădere a activităţii catalazei. Dozele mai masive de fier, aplicate la şobolani, micşorează de asemenea activitatea acestei enzime. În boala canceroasă se ştie că la blocarea sintezei hemoglobinei se mai adaugă şi hemoliza crescută, produsă de un factor plasmatic [17]. Presupunem că concentraţia fierului în sînge şi felul în care se realizează combinaţia metal-enzimă sînt factori determinanţi în modificările instalate. În anumite împrejurări, fierul poate să realizeze, prin combinarea sa cu enzima, modificări structurale, care, la rîndul lor, influenţează activitatea acesteia. În literatura de specialitate sînt date care demonstrează că în tulburările metabolismului fierului aportul de fier nu numai că nu este salutar pentru organism, dar poate să producă chiar unele modificări patologice [18]. Dacă luăm în considerare contribuţia catalazei sanguine la asigurarea proceselor de respiraţie tisulară, această inhibiţie enzimatică datorită fierului accentuează importanţa fenomenului descris.

Din datele prezentate reiese că modificarea activităţii catalazei sanguine în cursul feroterapiei poate să dea indicii pentru interpretarea mai justă a eficacităţii tratamentului aplicat. În situaţia de faţă este admis că, dacă după 3 săptămîni de tratament nu sînt semne evidente de refacere, nu mai este logic să se continue tratamentul. Pe baza rezultatelor obţinute considerăm că, dacă în prima perioadă a tratamentului (7—10 zile) activitatea catalazei sanguine nu creşte sau chiar scade, tra-

tamentul trebuie să fie suspendat, pentru a preveni modificările patologice semnalate mai sus.

Feroterapia fiind însoţită, în schema noastră terapeutică, de vitamine, se poate pune întrebarea dacă fierul sau vitaminele au contribuit la modificările descrise. Întrucît provocarea cu fier aduce modificări similare celor ale tratamentului, putem să afirmăm că rolul vitaminelor în această privinţă a fost secundar.

Descompunerea apei oxigenate de către catalază fiind numai una dintre funcţiile mai principale ale enzimei [6], [16], metoda noastră de cercetare nu poate să ne furnizeze decît indicaţii principale. Datele experimentale obţinute accentuează însă importanţa acestor studii, care pot să contribuie la elucidarea corelaţiilor existente între medicamente şi enzime.

CONCLUZII

1. Activitatea catalazei sanguine a fost modificată în urma acţiunii fierului bivalent.

2. *In vitro* s-a evidenţiat acţiunea catalitică a sulfatului feros.

Fierul, venind în contact cu enzima, de la o anumită concentraţie îi inhibă activitatea.

3. La şobolani, cantităţile mai reduse de fier stimulează, iar cele mai mari inhibă activitatea catalazei sanguine.

4. Tratamentul îndelungat cu tonofer asociat cu vitamine, aplicat în anemiile feriprive, stimulează activitatea enzimei. În boala canceroasă însă, aportul de fier inhibă în mod foarte semnificativ activitatea catalazei sanguine.

5. Activitatea catalazei sanguine, determinată în cursul feroterapiei, poate să dea indicaţii pentru o interpretare mai justă a tratamentului aplicat.

Prezentată la redacţie la 4 ianuarie 1966

Policlinica nr. 2
Spitalul clinic unificat, Tg. Mureş

BIBLIOGRAFIE

1. Abderhalden R., *Vitamine, Hormone, Fermente*, Springer Verlag, Berlin, 1953.
2. Balint P., Hegedüs A., *Klinikai laboratoriumi diagnosztika*, Müvelt Nép, Budapest, 1953.
3. Barta Gy., *Enzimek*, Budapest, 1954.
4. Benard H., Gajdos A., Tissier M., *Hémoglobine et pigments apparentés*, Masson, Paris, 1949.
5. Bingold K., *Über die Bedeutung der Katalase in biologischer und klinischer Beziehung*, Dtsch. med. Wschr., **80**, 603 (1953).
6. Csontos A., *Unele relaţii între activitatea catalazei sanguine şi secreţia acidului clorhidric din stomac*, Med. int., **14**, *1*, 313 (1964).
7. Csontos A., Nuszl L., *Modificarea activităţii catalazei sanguine la şobolani inoculaţi cu tumori*, Rev. med., **10**, 289 (1964).
8. Csontos A., Birău H., *Acţiunea histaminei asupra catalazei sanguine*, Med. int., **17**, 331 (1964).
9. Csontos A., *Determinarea activităţii catalazei sanguine, metodă de investigaţie în depistarea bolii canceroase*, Oncologia şi radiologia, **4**, 203 (1965).

10. Csontos A., *Acțiunea histaminei, adrenalinei și ACTH-ului asupra activității catalazei sanguine*, St. cerc. biochim., **8**, 307 (1965).
11. Csontos A., *Acțiunea tonoferului asupra activității catalazei sanguine*, Simp. „Medicamente și enzime", Cluj, 26—27 noiembrie, 1965.
12. Eskenasy Al., *Anemiile*, Edit. medicală, București, 1955.
13. Gitter A., Heilmeyer L., *Manual de probe funcționale clinice*, Edit. medicală, București, 1960.
14. Georgescu P., Păunescu E., *Metode biochimice de diagnostic și cercetare*, Edit. medicală, București, 1960.
15. Macovschi E., *Materia vie și problema raporturilor dintre medicamente și enzime*, St. cerc. biochim., **9**, 11 (1966).
16. Micu D., Maximilian S., Mihăilescu E., *Valoarea indicelui catalazic în orientarea radioterapiei leucozelor*. Med. int., **13**, 101 (1963).
17. Popescu E. R., *Fiziopatologia fierului. Anemiile hipocrome*, Edit. medicală, București, 1958.
18. Soru E., *Biochimie medicală*, vol. I, Edit. medicală, București, 1959.
19. Straub F. B., *Biokémia*, Edit. Medicina, Budapesta, 1958.
20. Takahara S., *Die Akatalasemie*, Dtsch. med. Wschr., **40**, 222 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., **10**, *1*, 13–17 (1967)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL MODIFICĂRII PROPRIETĂȚILOR ELECTROFORETICE ALE PROTEINELOR SUB ACȚIUNEA RADIAȚIILOR IONIZANTE ȘI PRIN COMPLEXARE CHIMICĂ

GH. FURNICĂ și C. TEODORESCU

577.01

Rezumat. — S-au iradiat cu radiații *gamma* de la ^{60}Co soluții de proteine la doze cuprinse între 10^5 și 10^6r. Analiza electroforetică indică transformări la nivelul funcțiilor ionizabile și al rețelei macromoleculare. Se constată o radiosensibilitate superioară a globulinelor în raport cu albumina. Complexarea unor molecule mici, ca, de exemplu, amino-etilen-izotiuroniul (AET) la proteine, maschează o parte a funcțiilor disociabile. Astfel se modifică migrarea electroforetică a macromoleculelor.

Conform teoriei lui Ostwald, prin dizolvarea eucoloizilor se formează direct soluții coloidale, cu proprietăți electroforetice, care datorită funcțiilor polare generează stratul dublu electric al lui Helmholtz și care se mențin în echilibru pînă la apariția în mediul dispersant a unui potențial electric. Viteza de migrare electroforetică este dependentă de numărul funcțiilor disociabile.

Urmărindu-se efectul radiațiilor ionizante asupra albuminelor și globulinelor, s-a constatat o acțiune netă a lor la nivelul grupelor polare disociabile [1 — 6]. În acest sens ne-am propus să studiem acțiunea radiațiilor ionizante asupra funcțiilor polare și influența acestor modificări asupra migrării electroforetice a proteinelor.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a utilizat procedeul electroforezei pe hîrtie Whatman nr. 1. Benzile de hîrtie, late de 2,5 cm, așezate într-o cutie închisă de material plastic, fac legătura dintre două băi ce conțin soluția tampon barbitural la pH 8,6. Tensiunile folosite au fost de 120, 180 și 220 V, cu intensitatea de 5 mA pentru 8 benzi, la temperatura constantă de 10°C.

Soluțiile apoase de albumină 4% și globulină 2% (fabricație N.B.G.) au separat electroforetic un singur spot, bine conturat, conform imaginilor 1 din figura 1 și 13 din figura 5.

Serul uman proaspăt a separat cinci fracțiuni distincte ale proteinelor componente (vezi fig. 11 și 12).

Tamponul era o soluție de 2,75 g de acid dietilbarbituric și de 15,45 g de barbital de sodiu la 1000 ml, avînd forța ionică de 0,075 și pH-ul 8,6. Pentru unele probe la care s-a urmărit puritatea fracțiunii s-au utilizat tampoane cu pH 7,2, 8,6 și 9,2.

Developarea benzilor s-a efectuat prin colorarea cu albastru de bromfenol.

REZULTATE

Acţiunea hidrolizantă a apei, ce are loc în soluţie, nu modifică mult aspectul spotului. Se constată o îngustare la spotul albuminei conservate 5 zile în soluţie apoasă la 20°C, cu un contur de separare difuz şi mai larg (fig. 1). Iradierea soluţiilor de albumină proaspătă cu doza de $1{,}5 \cdot 10^6$ r determină o lărgire a spotului, cu o graniţă de separare difuză. Spoturile din figura 1 se găsesc la o distanţă practic egală faţă de linia de start. Prin hidroliză, degradarea unei porţiuni din cantitatea de albumină determină îngustarea spotului. La iradiere apar componente neseparabile pe această cale, care lărgesc spotul albuminic. Metoda electroforezei pe hîrtie este totuşi limitată în separarea eventualelor fracţiuni proteice apărute după iradiere.

Soluţiile de albumină iradiată se comportă diferit la conservarea în timp şi în condiţii deosebite de temperatură. Se observă că la temperatura de 43°C, după 7 zile, spotul albuminei iradiate devine foarte difuz şi lasă o trenă. La albumină, după iradiere şi conservare la temperatura de 4°C, fenomenul menţionat lipseşte. Se observă o lărgire a spotului comparativ cu spotul obţinut imediat după iradiere (fig. 3).

Complexarea AET (5,2-amino-etilen-izotiuroniu) la albumină este clar demonstrată în benzile electroforetice din figura 4, în care adaosul de 40 mg AET/ml de soluţie determină menţinerea pe start a unei proporţii ridicate de albumină, iar cealaltă parte realizează o dîră ce nu ajunge pînă la jumătate din distanţa de migrare a proteinei. Se poate admite că AET-ul s-a legat la majoritatea funcţiilor disociabile ale albuminei. Cantitatea de 20 mg de AET/ml de soluţie nu permite separarea unui spot nici chiar pe linia de start, iar cantitatea de 10 mg/ml permite izolarea unui spot aproape de distanţa de migrare a albuminei. În condiţiile unor cantităţi mai mici, AET-ul se leagă numai cu un anumit procent de funcţii, fără a bloca restul funcţiilor disociabile, permiţînd în felul acesta ca noul complex format să migreze electroforetic.

Electroforeza soluţiilor de globulină utilizată în experienţe (*gamma*-globulină bovină, fracţiunea a II-a) arată o puritate ridicată. Spotul izolat electroforetic, imediat după dizolvare, pare a fi omogen, cu aspect reproductibil şi la soluţia apoasă conservată 5 zile la temperatura de 20°C (fig. 5). Iradierea soluţiilor de *gamma*-globulină determină modificări mai profunde comparativ cu cele de albumină. În acest caz nu se mai izolează un spot la distanţa caracteristică de migrare a globulinei neiradiate. Se observă pe linia de start existenţa unui spot difuz, care apoi se prelungeşte pînă aproape de zona spotului globulinic (fig. 6). După aproximativ 3 zile de la iradiere se constată că se pot separa cîteva spoturi. Conservarea la 4°C duce la formarea unui spot puţin conturat şi mai îndepărtat de linia de plecare, în timp ce la temperatura de 43°C spotul este mai conturat şi mai aproape de linia de start (fig. 6).

Gamma-globulina se complexează cu radioprotectorul AET, diminuîndu-şi complet migrarea electroforetică la adăugarea unei cantităţi de 24 mg de AET/ml. Iradierea complexului globulină-AET nu permite să se evidenţieze electroforetic vreo diferenţă semnificativă (fig. 7). De menţionat faptul că la globulină se observă modificări şi la doza de $4 \cdot 10^5$r, separîndu-se un spot între cel al globulinei şi linia de start. Comparativ

cu banda electroforetică a globulinei iradiate la $1{,}5 \cdot 10^6$r, prin iradierea la $4 \cdot 10^5$ r se poate separa spotul globulinei de intensitate inferioară spotului proteinei neiradiate.

Iradierea *gamma*-globulinei cu o doză de $2 \cdot 10^5$r atrage după sine modificări superficiale, dificil de decelat pe cale electroforetică. Se constată o intensitate mai slabă a spotului globulinei. Electroforeza globulinei iradiate cu $2 \cdot 10^5$ r la pH 8,6 (fig. 8) sau la pH 7,2 nu permite evidențierea netă a neomogenității spotului. Totuși, la pH 8,6 se constată o dîră difuză.

Studiul radiosensibilității biopolielectroliților poate fi efectuat și asupra amestecului de proteine din serul uman, din care se separă, în condițiile menționate în lucrare, un număr de 5 fracțiuni, și anume: albumine, *alfa-1*-globuline, *alfa-2*-globuline, *beta*-globuline și *gamma*-globuline (fig. 11 și 12).

Iradierea serului cu doze mari a permis să se scoată în evidență radiosensibilitatea comparativă a proteinelor menționate. Astfel, dozele de $1{,}5 \cdot 10^6$ r și $2{,}0 \cdot 10^6$ r determină modificări diferite în viteza de migrare electroforetică a polielectroliților (fig. 11 și 12). Se constată că fracțiunile *alfa-2*- și *beta*-globulinice se întrepătrund și dispare zona de separare.

DISCUȚIA REZULTATELOR

Rezultatele obținute par să arate că la globulină se evidențiază o radiosensibilitate mai mare decît la albumină. La doze similare, efectele radiațiilor sînt mai profunde pentru globulinele *gamma*. Se poate admite că la globuline se produce mai ușor procesul de reticulare a macromoleculei sau în același timp se desprind de pe polimer un număr mai mare de funcții disociabile.

Trebuie menționat că unii cercetători au stabilit o radiosensibilitate crescută la albumine [5], pe cînd Wakabayaski și colab. indică o sensibilitate mărită a globulinelor [6]. L. M. Buruiană [5] constată o radiosensibilitate crescută a albuminelor în condiții de mediu diferite față de cele din lucrarea prezentă, ceea ce arată că sensibilitatea proteinelor este strict dependentă și de condițiile mediului extern.

Prin experiențele noastre urmărim să explicăm o serie de transformări profunde la nivelul globulinelor, care s-au constatat în cadrul organismului iradiat.

Se pare că la temperaturi ridicate se declanșează în macromoleculă o serie de procese întîrziate, care se dezvoltă lent în cazul conservării la rece. Probabil au loc reticulări intramoleculare sau procese în care se desprind de pe macromoleculă funcții disociabile.

Dependent de cantitatea de AET, se vor bloca succesiv funcțiile de proteină care au importanță electroforetică (probabil -SH), iar în continuare se leagă și celelalte funcții cu rol deosebit în migrarea electroforetică, cum sînt: —OH, —COOH, NH_2 etc. Astfel poate fi interpretată comportarea electroforetică a proteinelor în prezența unor cantități diferite de AET.

Stabilitatea față de hidroliză s-a constatat a fi minimă la *alfa-1*-globuline, care nu mai sînt separabile electroforetic după conservarea serului

timp de 4 zile la 4°C; se poate afirma că și componenta *alfa-2*-globulinică nu se mai separă net după această perioadă.

Acțiunea radiațiilor (fig. 11 și 12) afectează componenta *alfa-1*- și *beta*-globulinică, spre deosebire de efectul hidrolizant, care nu provoacă modificări profunde *beta*-componentelor.

Complexarea *gamma*-globulinei cu AET, analog albuminei, blochează toate funcțiile ce participă la migrarea electroforetică, atunci cînd AET se găsește în exces față de proteină (fig. 9). Cantități mai mici de AET blochează o parte a funcțiilor organice, lăsînd libere numeroase funcții disociabile, care participă la migrarea electroforetică, permițînd izolarea spotului globulinic. Bineînțeles, acest spot este mult mai slab colorat decît cel al proteinei inițiale, necomplexate cu AET.

Complexarea *gamma*-globulinei cu *alfa*-cloraloză, chiar la cantitatea maximă solubilă de 15 mg/ml, nu împiedică proteina să separe spotul său caracteristic. Aceasta indică un proces de complexare numai la funcțiile nedisociabile în condițiile electroforetice (fig. 10). Probabil că acest proces prezintă una din explicațiile comportării diferite a celor doi radioprotectori (AET și cloraloză). Compușii menționați protejează în mod diferit polielectroliții macromoleculari sintetici, după cum s-a arătat în lucrări anterioare [7], [8]. Se admite în organism pentru fiecare substanță un mecanism de acțiune diferit. Această diferență de comportare pare a fi demonstrată și în cazul reacțiilor de complexare cu proteinele. AET-ul blochează globulina pe linia de start, în timp ce complexul globulină-cloraloză migrează electroforetic.

CONCLUZII

1. Radiațiile ionizante modifică viteza de migrare electroforetică a proteinelor la doze superioare valorii de 10^5r. Efectul constă probabil în desprinderea unor funcții ionogene și eventual în creșterea reticulării macromoleculei.

2. Iradierea soluțiilor de albumină și de globulină cu radiații *gamma* arată o sensibilitate superioară a globulinelor.

3. Complexarea unor micromolecule cu proteine atrage după sine modificarea vitezei de migrare electroforetică a macromoleculei.

Prezentat la redacție la 19 aprilie 1966

Institutul de igienă, București,
Laboratorul de radiații
și
Catedra de igiena muncii,
I.M.F., București

BIBLIOGRAFIE

1. Crowther J. A., Liebman H., *An effect of gamma-radiation on egg albumin*, Nature, **143**, 598 (1939).
2. Kepp R. K., Michel K. F., *Electrophoretic studies on the action of Röntgen rays on aqueous solutions of proteins*, Strahlentherapie, **92**, 416 (1953).

3. HAISSINSKY M., GLUZBARG W., *Actions of ionizing radiations on colloidal solutions*, C. R. Acad. Sci., **233**, 1 192 (1951).
4. DALE W. M., RUSSEL C., *A study of the irradiation of catalase by ionizing radiation in the presence of cysteine, cystine and glutathiane*, Biochem. J., **62**, 50, (1956).
5. BURUIANĂ L. M., St. cerc. biochim., **4**, 473 (1961).
6. WAKABAYASKI M., KAWAMURA F., OKIADE J., Jap. J. Physiol., **5**, suppl. 383 (1956).
7. COSTĂCHEL O., FURNICĂ GH., POPOVICI O., FURNICĂ M., *Efectul asociat de radioprotecție chimică al S,2-amino-etilen-izotiuroniului (AET) cu clorpromazină și cloraloză*, St. cerc chim., **IV**, 341 (1958).
8. COSTĂCHEL O., FURNICĂ GH., DRĂGUȚ A., *Contribuții la studiul mecanismului chimic de acțiune radioprotectoare a S,2-amino-etilen-izotiuroniului și 2-mercaptoetilenaminei*, St. cerc. chim., **III**, 409 (1959).

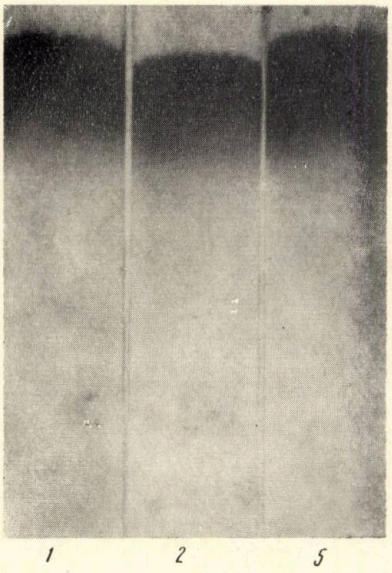


Fig. 1. — Electroforeza soluţiilor 4% de albumină N.B.C.

(*1* — albumină, soluţie proaspătă; *2* — albumină, soluţie după 5 zile la 20°C; *5* — albumină, soluţie proaspătă iradiată cu $1{,}5 \cdot 10^6$r).

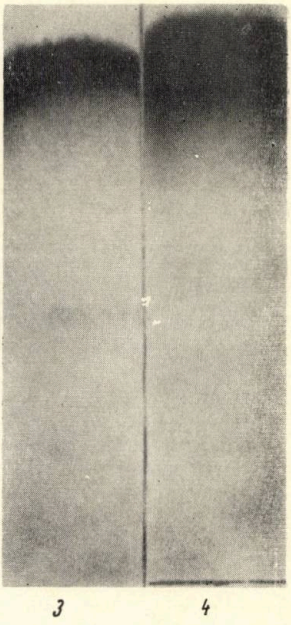


Fig. 2. — Electroforeza soluţiilor de albumină N.B.C.

(*3* — albumină, soluţie proaspătă; *4* — albumină, soluţie iradiată cu $1{,}5 \cdot 10^6$ r).

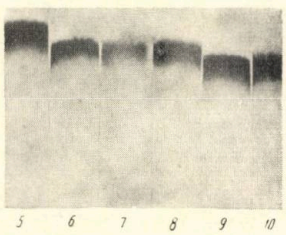


Fig. 3. — Electroforeza soluţiilor 4% de albumină N.B.C.

(*5* — albumină, soluţie proaspătă iradiată cu $1{,}5 \cdot 10^6$ r; *6* — albumină, soluţie după 4 zile la 4°C; *7* — albumină, soluţie proaspătă iradiată cu $1{,}5 \cdot 10^6$r, după 24 de ore la 4°C; *8* — albumină soluţie proaspătă iradiată cu $1{,}5 \cdot 10^6$r, după 48 de ore la 43°C; *9* — albumină, soluţie proaspătă iradiată cu $1{,}5 \cdot 10^6$ r, după 48 de ore la 4°C; *10* — albumină, soluţie iradiată cu $1{,}5 \cdot 10^6$ r. după 7 zile la 43°C).

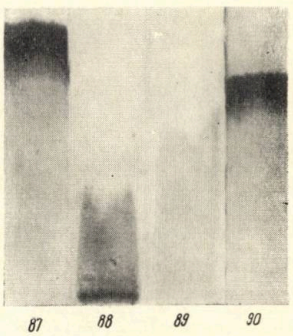


Fig. 4. — Electroforeza soluţiilor 4% de albumină N.B.C.

(*87* — albumină, soluţie proaspătă; *88* — albumină, soluţie proaspătă cu 40 mg/ml AET; *89* — albumină, soluţie proaspătă cu 20 mg/ml AET; *90* — albumină, soluţie proaspătă cu 10 mg/ml AET).

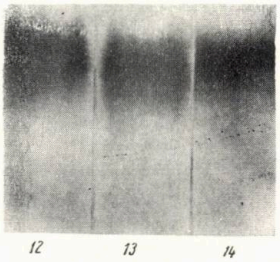


Fig. 5. — Electroforeza soluțiilor 2% de *gamma*-globulină N.B.C.

(*12* — globulină, soluție după 5 zile la 20°C; *13* — globulină, soluție proaspătă; *14* — globulină, soluție după 2 zile la 20°C).

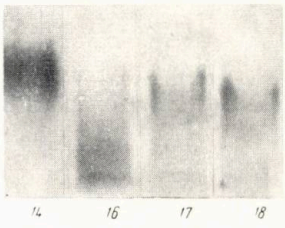


Fig. 6. — Electroforeza soluțiilor 2% de *gamma*-globulină N.B.C.

(*14* — globulină, soluție după 2 zile la 20°C; *16* — globulină, soluție proaspătă iradiată cu $1,5 \cdot 10^6$r, după 2 zile la 20°C; *17* — globulină, soluție proaspătă iradiată cu $1,5 \cdot 10^6$r, după 3 zile la 4°C; *18* — globulină, soluție proaspătă iradiată cu $1,5 \cdot 10^6$r, după 3 zile la 43°C).

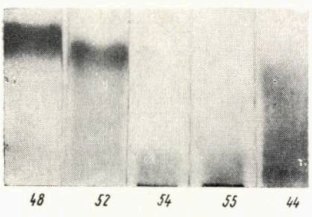


Fig. 7. — Electroforeza soluțiilor 2% de *gamma*-globulină N.B.C.

(*48* — globulină, soluție proaspătă; *52* — globulină, soluție proaspătă iradiată cu $4 \cdot 10^5$r; *54* — globulină, soluție proaspătă cu 24 mg/ml AET; *55* — globulină, soluție proaspătă cu 24 mg/ml AET, iradiată cu $4 \cdot 10^5$r; *44* — globulină, soluție proaspătă iradiată cu $1,5 \cdot 10^6$r).

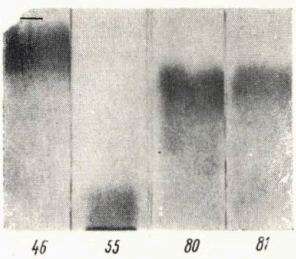


Fig. 8. — Electroforeza soluțiilor 2% de *gamma*-globulină N.B.C.

(*46* — globulină, soluție proaspătă; *55* — ca la figura 7; *80* — globulină, soluție proaspătă iradiată cu $2 \cdot 10^5$r; *81* — globulină, soluție proaspătă iradiată cu $2 \cdot 10^5$r, migrare la pH 7,2).

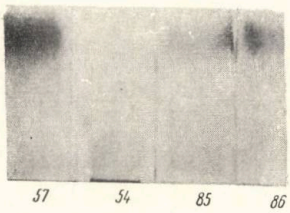


Fig. 9. — Electroforeza soluțiilor 2% de *gamma*-globulină N.B.C.

(*57* — globulină, soluție proaspătă; *54* — globulină, soluție proaspătă cu 24 mg/ml AET; *85* — globulină, soluție proaspătă cu 10 mg/ml AET; *86* — globulină, soluție proaspătă cu 5 mg/ml AET).

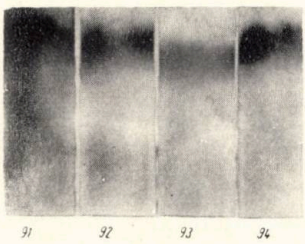


Fig. 10. — Electroforeza soluțiilor 2% de *gamma*-globulină N.B.C.

(*91* — globulină, soluție cu 15 mg/ml *alfa*-cloraloză; *92* — globulină, soluție proaspătă cu 10 mg/ml *alfa*-cloraloză; *93* — globulină, soluție cu 5 mg/ml *alfa*-cloraloză; *94* — globulină, soluție proaspătă).

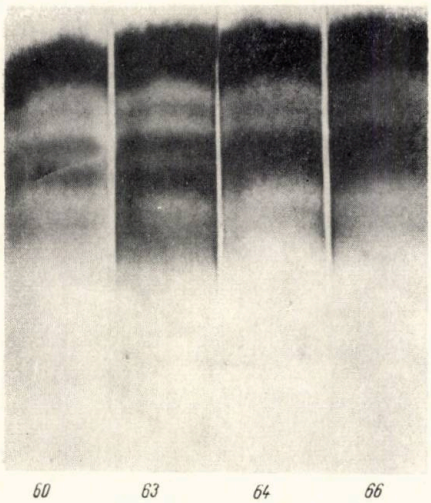


Fig. 11. — Electroforeza serului uman (*60* — ser proaspăt; *63* — ser proaspăt; *64* — ser_r proaspăt iradiat cu $1{,}5 \cdot 10^6$r; *66* — idem cu 64).

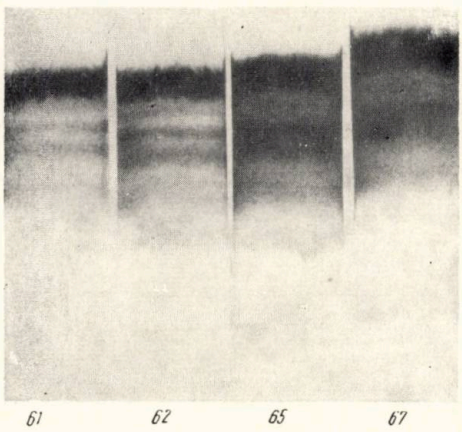


Fig. 12. — Electroforeza serului uman (*61* — ser proaspăt; *62* — idem cu *61*; *63* — ser proaspăt iradiat cu $1{,}5 \cdot 10^6$r; *67* — ser proaspăt iradiat cu $2 \cdot 10^6$r).

ST. CERC. BIOCHIM., **10**, *1*, 19–29 (1967)

DISTRIBUȚIA ȘI MODIFICAREA ANTIGENICITĂȚII ALBUMINEI UMANE FLUORESCENTE, REȚINUTĂ ÎN ORGANELE, CELULELE ȘI UMORILE UNOR ANIMALE DE EXPERIENȚĂ

V. GHEȚIE, C. MEDEȘAN și N. ȘT. CHIȘIU

Rezumat. — După inocularea intraperitoneală sau intravenoasă a cobailor și șobolanilor cu albumină umană fluorescentă, un însemnat procent din proteină se localizează la nivelul intestinului subțire.

În interiorul celulelor hepatice, la iepuri inoculați subcutan cu antigenul fluorescent, cea mai mare parte din acesta se găsește asociat cu fracțiunea bogată în lizozomi (fracțiunea de 20 000 *g*/10 min). Antigenul se găsește în interiorul lizozomilor în diferite stări de degradare, care amintesc acțiunea unor proteaze *in vitro*.

Antigenele modificate pot fi eliminate prin urină, unde pot fi recunoscute alături de unii produși de hidroliză (peptide și aminoacizi).

Pentru stabilirea căilor prin care antigenele induc formarea anticorpilor au fost întreprinse cercetări pentru evidențierea *organelor* în care se concentrează antigenele, s-a urmărit apoi localizarea lor *la nivelul celulelor* și, în sfîrșit, recent s-au lămurit unele aspecte ale distribuției lor între *fracțiunile subcelulare*.

Datele privind localizarea antigenelor în organele animalelor normale [1] au condus la concluzia că organele principale care prind antigenul sînt ficatul, splina, plămînii, ganglionii limfatici și măduva osoasă. Calculînd însă cantitatea de antigen care rămîne în afara acestor organe principale, am constatat că, în funcție de natura antigenului injectat și de momentul în care s-a făcut observația, rămîn în afara organelor amintite între 30 și 80% din antigen [1]. Desigur că un procent însemnat de antigen se găsește în sînge și în urină. Pe lîngă aceste compartimente, pot exista și alte organe care să înmagazineze cantități importante de antigen. Unul dintre aceste organe poate să fie *intestinul subțire*. Am făcut această presupunere bazați pe lucrările lui S.B. Andersen și colab. [2], [3] și Watterfors și colab. [4], care au demonstrat că intestinul poate fi locul de catabolizare a albuminei și *gamma*-globulinelor autologe. De aceea, pare logică presupunerea că la acest nivel s-ar putea fixa un procent însemnat din antigenul eterolog injectat (mai ales dacă este de tipul proteinelor serice) și care poate să fie catabolizat total sau parțial prin mecanismele ce se aplică și pentru ca abolizarea proteinelor autologe.

În lumina acestor presupuneri, primul scop al prezentei lucrări a fost *să se stabilească dacă intestinul poate fi un loc de concentrare a antigenului.*

Al doilea nivel la care s-a cercetat reținerea antigenelor în organism a fost unul cu adresă celulară precisă (vezi de exemplu [1]). Există evidențe experimentale [1] că, după injectarea antigenului, acesta poate ajunge printr-un proces de pinocitoză în diferite celule, inclusiv celulele reticulo-endoteliale ale multor țesuturi. Între aceste celule, o poziție specială o au macrofagele, care nu numai că sînt capabile să fagociteze (pinociteze) antigenul, ci și să transfere apoi un material imunogenic ce conține atît fragmente de antigen și (sau) ARN la limfocitele ganglionilor limfatici cu care sînt în contact prin intermediul unor punți citoplasmatice [5], [6].

Există însă prea puține informații asupra distribuției intracelulare și a catabolismului antigenelor proteice înainte ca materialul imunogenic să fie transferat la celule cu potențial formator de anticorpi. Datele de pînă acum arată că atît antigenele corpusculare (de exemplu [7]), cît și cele solubile [8], [9] se localizează la nivelul *lizozomilor*. Există indicații certe că macromoleculele ajunse din circulație în celule pot să devină asociate cu lizozomii și să fie degradate de către aceștia [7], [9], [10]. Experiențele existente [11], [12], [13] sugerează că antigenele sînt întîi degradate în fragmente „active" antigenic, care sînt capabile să inițieze formarea anticorpilor. D. Campbell și J. Garvey [12] au arătat că cea mai mare parte din materialul antigenic este fragmentat (*n.n.* : probabil în lizozomi), se eliberează și se asociază cu ARN solubil din citoplasmă [14].

Modul în care este degradat antigenul și natura fragmentelor de hidroliză ce persistă pe acest nivel reprezintă o problemă-cheie la care fie că nu s-au adus date experimentale directe, fie că experiențele n-au fost încununate de succes [15], 16].

De aceea, al doilea scop al acestei lucrări a fost acela de a urmări *soarta antigenului la nivelul lizozomilor*, pentru a detecta relicvele de antigen prezente aici.

În lucrarea prezentă am utilizat marcarea albuminei serice umane, folosită ca antigen, cu izotiocianatul de fluoresceină și clorura de *1*-dimetil-amino-naftalin-*5*-sulfonil (clorura de Dansil) [17]. Am preferat utilizarea unei metode mai puțin sensibile decît cea cu izotopi radioactivi, din următoarele motive : *a*) metoda permite observarea directă a localizării antigenului în organe și prelevarea imediată a țesutului devenit fluorescent ; *b*) datele obținute prin metode imunochimice și biochimice pot fi completate cu date citologice ; *c*) spre deosebire de I^{131}, care poate fi metabolizat [18], trasorii fluorescenți utilizați, în special clorura de Dansil, reacționează cu proteinele formînd o legătură greu atacabilă de enzimele intracelulare [19] ; *d*) prin metode adecvate se poate determina, atît în extracte, cît și în preparatele microscopice, măsura în care fluorescența este legată de antigenul inițial.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele s-au efectuat pe iepuri Chinchilla de 2,5 kg, pe cobai de 300—400 g și pe șobolani de 200—250 g.

Marcarea albuminei serice umane. Albumina serică s-a izolat și s-a purificat după o tehnică asemănătoare celei descrise de S. E. Michael [20]. S-a procedat astfel : peste 100 ml ser

de om proaspăt recoltat s-au adăugat treptat, sub agitare, 500 ml etanol absolut ce conține HCl 0,02 N. S-a centrifugat soluția și s-a îndepărtat precipitatul globulinic. Supernatantul s-a neutralizat cu o soluție NH_4OH concentrată, ceea ce a determinat precipitarea albuminei. S-a centrifugat, iar precipitatul s-a dizolvat într-o soluție tampon de carbonat-bicarbonat pH 9,0, 0,05 M care s-a dializat la rece, 24 de ore tot față de o soluție tampon carbonat-bicarbonat, pentru îndepărtarea urmelor de etanol. S-a ajustat concentrația proteică a dializatului la 2% și s-a fluorocromat fie cu clorură de Dansil prinsă pe celită [21], fie cu izotiocianat de fluoresceină (ITF) [22]. Excesul de fluorocrom nereacționat s-a îndepărtat prin filtrare pe Sephadex G-25 sau G-50, folosindu-se pentru eluție o soluție de NaCl 0,145 M. Albumina fluorescentă își păstrează antigenicitatea inițială și este liberă de orice impuritate detectabilă imunoelectroforetic cu un ser de cal antiom (provenit de la Institutul „Dr. I. Cantacuzino").

Formolizarea albuminei marcate cu ITF. S-a folosit metoda de formolizare recomandată de J. L. Mego și J. D. McQueen [23]. După formolizare, albumina reacționează mai slab cu serul de iepure antialbumină, linia de precipitare fiind mai difuză (tehnica Ouchterlony).

Obținerea serului antialbumină serică umană. Serul imun s-a preparat pe iepuri prin injectarea, o dată pe săptămînă, a unei doze de 10 mg albumină serică umană (NBC) în asociație cu adjuvant Freund complet, timp de 4—6 săptămîni.

Prepararea fracțiunilor subcelulare din ficat. S-a lucrat în linii generale după indicațiile lui G. H. Hogeboom [24], folosindu-se pentru omogenizare ficatul de iepure perfuzat *in vitro* cu soluție de zaharoză 0,25 M rece, timp de 20 min, pînă la îndepărtarea completă a sîngelui. Omogenizarea s-a efectuat la rece cu zaharoză 0,25 M într-un aparat Potter cu pistil de material plastic. Centrifugările s-au efectuat la +4°C, obținîndu-se următoarele fracțiuni: 940 *g* (20 min), 5 200 *g* (10 min), 20 000 *g* (10 min) și supernatantul. Înainte de a fi utilizate, fracțiunile s-au spălat de 2—3 ori cu o soluție 0,25 M de zaharoză. În fracțiunea de 940 *g* se găsesc, alături de resturi celulare și nuclei, și o anumită cantitate de lizozomi secundari [25], [9]. Fracțiunea de 5 200 *g* conține în principal mitocondrii grele, iar cea de 20 000 *g* mitocondrii ușoare, fracțiune bogată în lizozomi [16], [27]. În sfîrșit, supernatantul conține microzomii, alături de citoplasmă.

Pentru ruperea membranelor, fracțiunile izolate s-au suspendat într-o soluție de veronal-veronal sodic pH 8,2, 0,05 M, ce conține 0,4% dezoxicolat de sodiu (DOC). Amestecul s-a incubat 1 oră la 37°C, după care s-a centrifugat timp de 45 min la 20 000 *g* și apoi s-a separat supernatantul. În unele experiențe, la soluția tamponată de DOC s-a adăugat și iodacetamidă în concentrație de 0,02 M [23], [9] pentru inibarea activității catepsinelor.

Analiza imunochimică a preparatelor. Imunoelectroforeza s-a efectuat după tehnica Scheidegger [28], folosindu-se gel de agaroză 1% în tamponul veronal-veronal sodic de pH 8,6 și putere ionică 0,05 în cuvă și 0,016 în plăci. Potențialul a fost în jur de 10 V/cm, iar timpul de migrare a variat, în funcție de natura experienței, între 2 și 4 ore. Pentru identificarea antigenului s-au folosit mai ales testul propus de Osserman [29] și fluoroimunoelectroforeza [22].

Dubla difuzie s-a efectuat după tehnica Ouchterlony, în gel de agaroză 1%, folosindu-se o soluție de NaCl 0,145 M [30].

Determinarea fluorescenței legate și libere. În urină și în unele preparate tisulare s-au determinat procentul de fluorescență care rămîne legat de antigen și fluorescența eliberată în urma proteolizei.

S-a procedat astfel: la 1 ml umoare sau extract fluorescent s-a adăugat 1 ml TCA 10%. După centrifugare și îndepărtarea completă a supernatantului, precipitatul s-a reluat în 2 ml soluție de NaOH N/10. Fluorescența soluției s-a determinat fie în emisie cu un fluorometru Zeiss, fie prin absorbție la 470 mμ (pentru ITF) sau 325 mμ (pentru clorură de Dansil). Valoarea găsită reprezintă fluorescența legată de proteină (F_p). În mod similar, peste o altă porțiune de 1 ml din probă s-a adăugat 1 ml NaOH N/5, s-a amestecat, s-a centrifugat (cînd era cazul)

şi s-a determinat fluorescenţa printr-unul din procedeele amintite mai înainte. Valoarea găsită reprezintă fluorescenţa totală (F_t). Din valorile F_p şi F_t s-a calculat procentul de fluorescenţă liberă, nelegată de proteină ($F_l = \frac{100\ (F_t - F_p)}{F_t}$. S-a utilizat un mediu alcalin (NaOH N/10) pentru citirea fluorescenţei, deoarece la acest pH fluorescenţa este apreciabilă şi nu suferă variaţii în cursul experienţelor [31].

Prin cromatografie pe Sephadex G-25 sau G-50 s-au separat unii produşi de hidroliză şi astfel s-a putut calcula fluorescenţa care rămîne legată de fragmente proteice cu o greutate moleculară cuprinsă între 5 000 şi 10 000, alături de fluorescenţa legată de proteina iniţială, şi de cea eliberată.

Inocularea animalelor şi tehnica de abordare chirurgicală a intestinului. Injecţiile subcutanate, intramusculare şi intraperitoneale s-au efectuat în mod obişnuit, antigenul fluorescent fiind dizolvat într-o soluţie salină fiziologică în concentraţie de 1—2 %.

Injectarea intravenoasă a şobolanilor s-a practicat astfel : animalele s-au anesteziat cu uretan (0,4 ml/100 g greutate dintr-o soluţie 20 %), subcutan. După imobilizarea animalului, s-a tăiat coada, din care s-au recoltat circa 2,5 ml sînge. S-a practicat apoi o incizie a abdomenului, urmărindu-se linia mediană pe o lungime de 3 cm. S-a exteriorizat intestinul subţire, din care s-a ales o porţiune de circa 10 cm lungime. S-au făcut apoi două butoniere la capetele distale ale porţiunii alese, introducîndu-se două canule de sticlă cu diametrul de 3 mm. S-a plasat ansa intestinală canulată între două fişii de vată îmbibate cu ser fiziologic şi menţinute la 37°C. Prin intermediul canulelor s-a efectuat spălarea ansei cu aproximativ 40 ml soluţie Tyrode la 37°C, iar după aceea ansa s-a umplut cu lichid şi s-au pensat tuburile de cauciuc pentru a nu permite ieşirea lichidului. Toate operaţiile au fost efectuate cu deosebită grijă pentru a nu leza intestinul.

În continuare, s-a evidenţiat vena iliacă externă şi s-au injectat 2,5 ml soluţie de albumină umană marcată cu ITF (200 mg). Scopul sîngerării iniţiale a fost de a preveni instalarea unei hipertonii cu hiperproteinemie, care ar fi putut eventual să modifice trecerea antigenului fluorescent la nivelul intestinului. După injectarea soluţiei, din 30 în 30 min s-a luat cîte o priză din conţinutul ansei intestinale prin dislocarea lichidului din interior cu cîte 5 ml soluţie Tyrode administrată printr-o seringă. După colectarea numărului de probe necesar, intestinul s-a scos, s-a examinat fluorescenţa în UV şi s-au prelevat diferite fragmente din intestin şi din alte organe, pentru controlul microscopic. S-a întors apoi intestinul pe dos, ca o mănuşă, şi s-a ras mucoasa cu o lamă de oţel, colectîndu-se materialul într-o soluţie răcită de NaCl 0,145 M, tamponată cu fosfat la pH 8,0, care conţine şi 0,02 M iodacetamidă. S-a omogenizat la + 4°C timp de 10 min şi apoi extractul s-a limpezit printr-o centrifugare de 30 min la 20 000 *g*. În supernatant s-au efectuat testele pentru identificarea albuminei.

Controlul microscopic al localizării antigenului fluorescent. Fragmentele de intestin, ficat şi rinichi au fost recoltate imediat după sacrificarea animalului, fixate şi prelucrate după tehnica lui G. de Saint-Marie [32] sau, unele, congelate în azot lichid şi secţionate în criostat la 5 μ grosime. Examenul microscopic a fost efectuat la microscopul IOR GM_1, echipat cu o lampă de mercur HBO—200. S-a folosit un filtru de excitaţie UG_1 şi de baraj GG_9. Pentru fiecare secţiune destinată cercetării în UV s-a reţinut şi secţiunea imediat următoare pentru colorare cu hematoxilină-eozină, în vederea precizării detaliilor de structură în raport cu zonele fluorescente.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Persistenţa şi starea antigenului în sînge şi urină

Experienţele efectuate pe şobolani şi cobai normali şi imunizaţi au dus la rezultate similare.

În sînge, după o injecție intraperitoneală conținînd 50—100 mg antigen marcat cu ITF, acesta poate fi recunoscut prin fluorescența probelor, coroborată cu testul imunochimic, pînă la 7—8 zile de la inoculare. Scăderea cantității de antigen în sînge se face după o curbă analogă cu cele obținute pentru eliminarea proteinelor serice marcate cu izotopi din sîngele diferitelor animale [33]. Testele de identificare efectuate prin imunodifuzie au arătat că albumina prezentă în sînge la 7—8 zile de la inoculare este identică antigenic cu cea inițială și, așa cum au menționat și și M. Richter și colab. [15], [16], nu se pot identifica produși de hidroliză ai albuminei.

În urina șobolanilor injectați intraperitoneal cu 100 mg albumină marcată cu ITF, se constată de asemenea prezența antigenului chiar la a 8-a zi de la inoculare. Este de semnalat că această albumină eliminată dă numai o reacție de identificare parțială cu albumina intactă, așa cum se observă și prin testul imunoelectroforetic, după Osserman, înfățișat în figura 1.

Din figură se observă că reacția de identificare este parțială (formarea pintenului la contopirea liniei de precipitare orizontală cu linia de precipitare a albuminei), ceea ce arată că albumina din urină și-a pierdut o parte din grupările determinate native (prin hidroliză).

Este de notat că albumina prezentă în urină și-a pierdut în cea mai mare parte fluorescența, deoarece prin fluoroimunoelectroforeză nu s-a putut observa persistența fluorescenței la nivelul liniei de precipitare caracteristică albuminei degradate. Această constatare pare să indice că ITF este desfăcut de proteină printr-un mecanism enzimatic independent de cel proteolitic, deoarece este puțin probabil ca modificările de antigenicitate semnalate mai sus să fi determinat și îndepărtarea fluorocromului fixat în moleculă. Datele noastre experimentale concordă cu cele obținute de F. A. Green [34] prin proteoliza *in vitro* a albuminei serice bovine marcate cu ITF. Autorul constată că fluorocromul este desfăcut independent de procesul de proteoliză totală, care determină apariția peptidelor, și, probabil, a aminoacizilor.

Analiza cromatografică, prin filtrare pe gel de Sephadex G-50, a unei probe medii de urină obținute prin contopirea urinii emise în zilele 2-4 de la injectare confirmă acest punct de vedere (fig. 2).

În fracțiunea I se găsește albumina marcată, intactă și parțial hidrolizată, așa cum o dovedește și analiza imunoelectroforetică a acestei fracțiuni (fig. 3).

Din figura 3 se observă că albumina antigenic intactă, prezentă în urină, determină prelungirea extremităților arcurilor de precipitare, iar cea parțial hidrolizată se racordează la arcul de precipitare specific, ceva mai sus. Prezența albuminei intacte explică fluorescența legată a fracțiunii I.

În fracțiunea III se găsește cea mai importantă parte din fluorescența legată a urinii (70%) și ea poate fi atribuită peptidelor sau aminoacizilor rezultați prin hidroliza unei părți din albumina inoculată. Această presupunere, bazată pe aprecierea volumului la care se eluează fracțiunea, a fost confirmată prin analiza cromatografică pe hîrtie*. S-au detectat 4

* Determinările au fost efectuate de D. Tănăsescu de la Institutul de biochimie, căruia îi mulțumim pe această cale.

spoturi cu fluorescență specifică și pozitive la reacția cu ninhidrină, situate în zonele de etalare a următorilor aminoacizi : 1) histidină, lizină și arginină ; 2) acid glutamic și treonină ; 3) metionină ; 4) valină. Identificarea exactă nu este posibilă, deoarece R_F aminoacizilor legați de ITF poate diferi de cel al aminoacizilor nemarcați, folosiți ca martor.

Fracțiunea III conține, probabil, un amestec de peptide mici și aminoacizi, deoarece Sephadex G-50 nu permite separarea peptidelor de aminoacizi.

În sfîrșit, fracțiunea cromatografică IV cuprinde în principal fluorocromul liber, raportul dintre mărimea fluorescenței și extincția la 280 mμ fiind de 10 ori mai mare ca la fracțiunea III.

Deoarece în sîngele șobolanilor nu s-a observat prezența albuminei modificate, s-ar părea că distrugerea unei părți din structura ei antigenică se produce fie la nivelul rinichiului, fie în urină, în timpul dintre emisie și analiză. Nu este însă exclus ca modificarea antigenului să se producă la nivelul altui organ, însă cantitatea de albumină modificată din sînge să fie sub limita de sensibilitate a metodelor noastre de detectare. Această posibilitate a fost sugerată de unul dintre noi într-o lucrare anterioară (figura 3 din [35]), în care s-a arătat că, după administrare orală de colostru, antigenele specifice pot fi identificate mai ușor în urină, în care acestea se concentrează, decît în sînge. Din acest motiv este posibil ca degradarea antigenului să aibă loc într-o regiune extrarenală. De altfel, pînă în prezent nu se cunoaște nici măcar locul unde se face degradarea unor proteine autologe, ca *gamma*-globulina de pildă, ale căror fragmente apar în urina normală.

Eliminarea urinară a proteinelor cu antigenicitate modificată a fost observată și la cobaii imunizați cu ser de iepure. Prin administrarea intraperitoneală a serului de iepure fluorescent (circa 250 mg proteină) se constată că în urinile de 24 și 48 de ore apare o cantitate însemnată dintr-o proteină cu mobilitate $alfa_2$-globulinelor de iepure, care și-a pierdut fluorocromul și care nu mai poate reacționa cu un ser imun de cobai antiiepure (fig. 4).

Localizarea antigenului la nivelul intestinului

Pentru observarea reținerii antigenului în organism s-a utilizat albumina fluorescentă formolizată, care este rapid eliminată din circulația sanguină și luată în cantități mari de ficat [23] și, posibil, și de alte organe. Această concentrare a antigenului este necesară pentru a distinge fluorescența specifică de autofluorescența unor organe.

După administrarea intravenoasă a 200 mg albumină fluorescentă formolizată, aproximativ 40 % din antigenul inoculat se localizează la nivelul intestinului, restul fluorescenței fiind distribuit mai ales în ficat și splină. Reținerea antigenului în interiorul celulelor a fost demonstrată prin examinarea unor preparate microscopice obținute din ficat, rinichi și intestin.

În ficat se constată o marginație ușor și difuz fluorescentă a capilarelor sinusoide interesînd, probabil, spațiul Disse. În unele cazuri s-a observat și un canal biliar cu epiteliul fluorescent, conținînd în lumen o substanță puternic fluorescentă. În rinichi, în funcție de timpul scurs de la injectare,

albumina fluorescentă conferă o fluorescență glomerulilor, tubilor contorți, ansei Henle sau tubilor colectori. Fluorescența în tubii contorți se prezintă sub formă de granule relativ mici, situate la polul bazal al celulelor.

În intestin se remarcă o fluorescență accentuată în celulele endoteliale, mai ales în cele situate spre și la vîrful vilozității. Topografia fluorescenței apare ca o lizieră la baza celulelor endoteliale și în zona corespunzătoare „bordurii în perie". Celulele endoteliale prezintă o fluorescență puternică, însă nu în toate vilozitățile și nici uniform în aceeași vilozitate. Subliniem că fluorescența datorită albuminei marcate se prezintă sub formă de granule mai mari sau mai mici, în timp ce autofluorescența apare sub forma unui film difuz. Astfel, în unele cazuri, granulele fluorescente situate spre polul bazal al celulelor cilindrice (niciodată în celulele calciforme) dădeau impresia unui șir de mătănii, întins la limita externă a axului conjunctiv-vascular al vilozității. În figura 5 se redă distribuția materialului fluorescent în endoteliu.

Din figură se observă deci că o bună parte din fluorescență se localizează la nivelul celulelor ce alcătuiesc mucoasa intestinală. Această observație a fost verificată și pe alte animale, la care s-a injectat albumina fluorescentă, neformolizată, și la care s-a examinat electroforetic și imunoelectroforetic extractul salin de mucoasă intestinală. În acest extract se pun în evidență electroforetic 7 componenți, dintre care unul are mobilitatea albuminei și prezintă o fluorescență specifică, deși foarte slabă (fig. 6).

Deoarece componentul cu cea mai mare mobilitate electroforetică este prezent și în extractele de mucoasă obținute de la animale neinjectate, este clar că numai o parte neînsemnată din el este alcătuită din albubina fluorescentă injectată. Așa se explică și fluorescența foarte slabă a acestei fracțiuni. Prezența neîndoielnică a albuminei fluorescente umane în extractele de mucoasă a fost demonstrată prin imunoelectroforeză, efectuîndu-se testul de identificare după Osserman (fig. 7).

Se remarcă prezența albuminei într-o formă antigenic nemodificată, arcul de precipitare al albuminei unindu-se cu linia de identificare fără nici un fel de pinten. Această constatare pare să arate că la nivelul mucoasei, în intervalul de 30-60 min, cercetat de noi, nu se poate detecta o alterare a structurii native a albuminei.

Constatarea noastră că intestinul poate fi un loc de reținere a antigenului este parțial de acord cu observația lui R.T. Smith și colab. [37]. Acești autori au observat că, injectînd iepurii nou-născuți cu albumină bovină marcată cu S^{35}, antigenul se localizează în proporție de 14-30 % în intestinul subțire. Această localizare pare a fi limitată la celulele mucoasei și nu se extinde și asupra celulelor din sistemul reticulo-endotelial. După părerea autorilor citați, această localizare se semnalează numai la animalele nou-născute, nu și la cele adulte, așa cum au fost animalele noastre de experiență.

Prezența albuminei am semnalat-o imunoelectroforetic nu numai în mucoasă, ci și în sucul intestinal. Aici ea suferă o degradare continuă în timp. Dacă după 30 min practic toată cantitatea de fluorescență este încă legată de proteină, după 140 min numai 44 % din fluorescență se găsește legată de proteină. Aceste date sînt în acord cu cele obținute de F.Armstrong și colab. [38], care au arătat că, în urma injectării animalelor cu albumină mar-

cată cu I^{131}, se constată că în sucul intestinal numai aproximativ 35 % din radioactivitate este legată de proteină. Împreună cu alte rezultate citate înainte [4], datele noastre conduc la concluzia că intestinul subțire are un rol important în catabolizarea albuminei. De aceea, reținerea antigenului fluorescent la acest nivel pare normală și ea poate să aibă o semnificație deosebită pentru desfășurarea ulterioară a procesului imun [39].

Asocierea antigenului cu lizozomii din ficatul de iepure

Detectarea albuminei marcate cu Dansil la nivelul celulei hepatice (la 12 zile după injectarea a 35-75 mg antigen) a arătat că principala cantitate de antigen se găsește localizată în fracțiunea de 20 000 *g*, ce conține mitocondrii ușoare și lizozomi (tabela 1).

Tabela 1

Repartizarea intracelulară a albuminei fluorescente în ficatul de iepure

Fracțiunea (centrifugare)	Prezența lizozomilor (date din literatură)	Fluorescența (lampă Wood)	Prezența albuminei (prin metoda Ouchterlony)
940 *g*	fagolizozomi	galbenă-lăptoasă	—
5 200 *g*	?	galbenă (ca Dansilul)	—
20 000 *g*	lizozomi	galbenă (ca Dansilul)	+
supernatant	—	brună	—

Se observă că, deși ambele fracțiuni, 5 200 *g* și 20 000 *g*, au fluorescența caracteristică fluorocromului, numai în fracțiunea de 20 000 *g* prezența fluorescenței coincide cu prezența albuminei. Aceste date au fost verificate și prin cercetarea repartizării unui antigen complex vegetal (vicilină + legumină), cu deosebirea că, în acest caz, proteina cu greutate moleculară mare (legumina) s-a identificat și în fracțiunea de 5 200 g. Rezultatele obținute sînt în acord cu cele publicate recent de J. Ivànyi și J. Černy [40]. Ei găsesc că, în ziua a 4-a de la injectarea păsărilor cu albumină umană marcată cu I^{131}, 83,7 % din radioactivitate se găsește asociată cu fracțiunea mitocondrială obținută prin centrifugare la 12 000 *g* timp de 90 min. Faptul că uneori antigenul a fost găsit și în fracțiunea de 5 200 *g*, sau, după alți autori [9], [23], și în cea de 900 *g* se poate explica fie prin impurificarea reciprocă a preparatelor, fie prin anumite particularități funcționale ale lizozomilor [10], [41].

Catepsinele cu care este dotat sistemul lizozomal al celulelor [10] sînt capabile în principiu să provoace fragmentarea antigenului injectat într-o manieră asemănătoare cu aceea care are loc și *in vitro* [11]. Noi am putut să punem în evidență, la nivelul lizozomilor, la unii iepuri cercetați, prezența unor fragmente de hidroliză, care se comportă imunoelectroforetic asemănător cu produșii de hidroliză peptică ai albuminei serice umane (fig.8).

Se observă că, în timp ce serul de iepure antialbumină nu detectează decît linia caracteristică albuminei, serul de cal antiom pune în evidență trei linii de precipitare, dintre care cea cu mobilitate electroforetică mai mică se aseamănă cu linia de precipitare ce apare prin hidroliza albuminei cu pepsină, tripsină sau chimotripsină [42]. Sînt de subliniat două aspecte : 1) extractele din lizozomii animalelor neinjectate nu dau această reacție ; 2) nu la toate animalele s-a reprodus această experiență. Cauzele nereproductibilității trebuie căutate în variația timpului de spălare și dializă a fracțiunilor subcelulare. S-a observat că, cu cît timpul de prelucrare se prelungea, cu atît mai puțin antigen se putea identifica în extracte. Probabil că — așa cum sugerează și datele lui P. L. Sawant și colab. [27], [43],—în cursul unei prelucrări prelungite se degradează tot antigenul existent pînă la fragmente care nu mai dau reacția de precipitare [42]. Așa s-ar putea explica de ce M. Richter și colab. [15],[16] n-au putut detecta prin imunodifuzie prezența antigenului în extractele de splină, deși extracția s-a practicat la scurt timp de la injectarea iepurilor cu albumină serică umană. De aceea, mai sînt încă necesare experiențe pentru a demonstra că produșii de hidroliză se găsesc în lizozomi în momentul extracției, și nu rezultă ulterior, în cursul operațiilor de prelucrare.

Antigenul este puternic legat de lizozomi. Faptul că el se eliberează numai după un tratament care rupe membrana granulelor (DOC) sugerează că acest antigen se găsește în interiorul lizozomilor și poate fi păstrat la acest nivel o perioadă lungă. G.L. Ada și J.M. Williams [44] consideră că, după depozitarea antigenului în lizozomi, acesta este eliberat treptat, timp îndelungat, și stimulează continuu formarea anticorpilor.

Aceste rezultate par să arate că lizozomii exercită o acțiune de control asupra antigenicității proteinei, determinînd astfel și calitatea răspunsului imun. De felul în care este hidrolizat antigenul depind numărul și structura antigenică a fragmentelor ce ajung în citoplasmă și, probabil, în mod corespunzător, și eterogenitatea și specificitatea anticorpilor formați. Dacă moleculele proteice sînt scindate la nivelul lizozomilor, așa cum arată datele noastre, atunci este de așteptat ca să se formeze anticorpi nu numai față de grupările determinante aflate la suprafața moleculei, ci și față de cele din interior, care sînt scoase „la suprafață" prin scindarea moleculei. Această posibilitate a fost dovedită, *in vitro*, de un număr de cercetători (de exemplu [13]).

CONCLUZII

În urma inoculării unui antigen în organism, o parte însemnată din acesta poate fi reținută la nivelul intestinului subțire, în mucoasa intestinală și în sucul intestinal. Rămîne de elucidat dacă antigenul fixat la acest nivel joacă un rol în imunogeneză sau aici este numai o poartă de eliminare a excesului de antigen.

În interiorul celulelor, antigenul se localizează în fracțiunile bogate în lizozomi ; de aceea se poate presupune că la acest nivel se triază antigenicitatea macromoleculelor. Prezența unor fragmente de hidroliză în extractul lizozomal sugerează existența unui proces hidrolitic care determină modificarea antigenicității moleculei inițiale. Hidroliza antigenului

apare deci ca un pas preliminar necesar pentru convertirea informației antigenice existente în molecula inițială în unități mai simple, inteligibile de către sistemul anticorpoformator.

Antigenele modificate circulă în sînge si se concentrează în urină, unde pot fi detectate ca atare. Modificarea antigenicității poate rezulta fie în urma acțiunii catepsinelor lizozomale de la nivelul unor organe ca rinichiul, intestinul, ficatul etc., fie în urma acțiunii unor enzime proteolitice existente în urină.

Prezentat la redacție la 17 septembrie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
și
Laboratorul de medicină experimentală al Spitalului „Dr. I. Cantacuzino", București

BIBLIOGRAFIE

1. D. H. Campbell, J. S. Garvey, *Nature of retained antigen and its role in immune mechanism*, Advanc. Immunol., **3**, 261 (1963).
2. S. B. Andersen, J. Glenert, K. Wallewik, *Gamma-globulin turnover and intestinal degradation of gamma-globulin in the dog*, J. clin. Invest., **42**, 1 873 (1963).
3. S. B. Andersen, M. Bjørneboe, *Gamma-globulin turnover in rabbits before and after hyperimmunization*, J. exp. Med., **119**, 537 (1964).
4. J. Watterfors, R. Gullberg, S. D. Liljedahl, L. O. Plantin, G. Birke, B. Olhagen, *Role of stomach and small intestine in albumin breakdown*, Acta med. scand., **168**, 347 (1960).
5. M. Fishman, F. L. Adler, *Antibody formation initiated in vitro. II. Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen*, J. exp. Med., **117**, 595 (1963).
6. B. A. Askonas, J. M., Rhodes, *Immunogenicity of antigen containing ribonucleic acid preparation from macrophages*, Nature, **205**, 470 (1965).
7. J. W. Uhr, G. Weissmann, *Intracellular distribution and degradation of bacteriophage in mammalian tissues*, J. Immunol., **94**, 544 (1965).
8. G. L. Ada, P. G. Lang, *Antigen in tissues. II. State of antigen in limph node of rats given isotopically labelled flagellin, haemocyanin or serum albumin*, Immunology, **10**, 431 (1966).
9. J. L. Mego, J. D. McQueen, *Further studies on the degradation of injected (^{131}I) albumin by secondary lysosomes of mouse liver*, Biochim. biophys. Acta, **111**, 166 (1965)
10. G. Weissmann, *Lysosomes*, New Engl. J. Med., **273**, 1 084 și 1 143 (1965).
11. C. Lapresle, T. Webb, *Degradation of a protein antigen by intracellular enzymes*, în Ciba Found. Sympos. Cellular Aspects of Immunity, Londra, Churchill, 1960, p. 44.
12. D. H. Campbell, J. S. Garvey, *The fate of foreign antigen and speculation as to its role in immune mechanism*, Lab. Invest., **10**, 1 126 (1961).
13. T. Ishizaka, D. H. Campbell, K. Ishizaka, *Internal antigenic determinants in protein molecules*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **103**, 5 (1960).
14. A. Saha, J. S. Garvey, D. H. Cambbell, *The physicochemical demonstration of the ribonucleic acid — antigen complex persisting in the liver of immunized rabbits*, Arch. Biochem., Biophys., 105, 179 (1964).
15. M. Richter, C. Larose, B. Rose, *The metabolism of antigens in vivo I. Protein antigens*, Canad. J. Biochem., **42**, 821 (1964).
16. A. Larose, B. Rose, M. Richter, *The metabolism of antigen in vivo. II. Azoprotein*, Canad. J. Biochem., **42**, 833 (1964).
17. R. C. Nairn, *Protein fluorescent tracing*, Edinburgh-Londra, E. & S. Livingstone, 1962, p. 83—96.
18. J. B. Stanbury, *Deiodination of the iodinated aminoacids*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **86**, 417 (1960).

19. C. W. Chadwick, M. G. Mc Entegart, R. C. Nairn, *Fluorescent protein tracers. A trial of new fluorochromes and the development of an alternative of fluorescein*, Immunology, **1**, 315 (1958).
20. S. E. Michael, *The isolation of albumin from blood serum or plasma by means of organic solvents*, Biochem. J., **82**, 212 (1962).
21. H. D. Schell, V. Gheţie, *Cuplarea clorurii de 1-dimentil-amino-naftalin-5-sulfonil cu proteinele serice şi purificarea conjugatelor obţinute*, St. cerc. biochem., **7**, 249 (1964).
22. V. Gheţie, *Fluoroimunoelectroforeza*, St. cerc. biochim., **9**, 361 (1966).
23. J. L. Mego, J. D. McQueen, *The uptake and degradation of injected labelled proteins by mouse-liver particles*, Biochim. biophys. Acta, **100**, 136 (1965).
24. G. H. Hogeboom, *Fractionation of cell components of animal tissues*, în S. P. Collowick, N. D. Kaplan, *Methods in Enzymology*, vol. I, Acad. Press, New York, 1955, p. 16.
25. C. De Duve, *From cytases to lysosomes*, Fed. Proc., **23**, 1 045 (1965).
26. C. De Duve, B. C. Pressman, R. Giaretto, R. Wattiaux, F. Appelmans, *Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue*, Biochem. J., **60**, 604 (1955).
27. P. L. Sawant, S. Shibko, U. S. Kumita, A. L. Tappel, *Isolation of rat-liver lysosomes and their general properties*, Biochem. J., **85**, 82 (1964).
28. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
29. E. F. Osserman, *A modified technique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs*, J. Immunol., **84**, 93 (1960).
30. O. Ouchterlony, *Gel-diffusion techniques*, în *Immunological Methods*, sub redacţia S. F. Ackroyd, Oxford, Blackwell, 1964, p. 55.
31. M. R. Klugerman, *Chemical and physical variables affecting the properties of fluorescein isothiocyanate and its protein conjugates*, J. Immunol., **95**, 1 165 (1965).
32. G. De Saint-Marie, *A parafin embedding technique for studies employing immuno-fluorescence*, J. Histoschem. Cytochem., **10**, 250 (1962).
33. N. O. Weigle, *The elimination of heterologous serum proteins from the blood of animals* în *Mechanism of antibody function*, Praga, Publ. House Czech. Acad. Sci, 1960, p. 53.
34. F. A. Green, *Proteolysis of fluoresceinated proteins*, Immunochemistry, **2**, 287 (1965).
35. N. Şt. Chişiu, *Cenzura proteinoclazică în absorbţia de proteine şi polipeptide din intestin*, St. cerc. biochim., **9**, 269 (1966).
36. CH. De Vaux St. Cyr, G. Hermann, *Étude immunochimique des γ-globulines de l'urine normale*, în *Protides in biological fluids*, Amsterdam, Elsevier, 1961, p. 326.
37. R. T. Smith, D. V. Eitzman, J. Robbins, J. Bellante, *Studies of induction of immunological tolerance to proteins in the new-born mammal*. în *Mechanism of immunological tolerance*, Praga, Publ. House Czech. Acad. Sci., 1962, p. 69.
38. F. B. Armstrong, S. Margen, H. Turner, *Plasma protein. VII. Site of degradation of serum albumin*, Proc. Soc. exp. Biol., **103**, 592 (1960).
39. V. Gheţie, C. Medeşan, N. Şt. Chişiu, *Retention and breakdown of fluorescent human albumin by the rat small intestine perfused "in situ"*, Rev. roum. biochim., **4**, 137 (1967).
40. J. Ivànyi, J. Černy, *The effect of protein antigen dosage on its elimination from the blood and organs*, Folia biologica, **11**, 355 (1965).
41. Hsu Lihn, A. L. Tappel, *Lysosomal enzymes of rat interstinal mucosa*, J. cell. Biol., **23**, 233 (1964).
42. M. Kaminsky, C. E. Tanner, *Étude comparative, par électrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse, de la dégradation de la sérumalbumine humaine par la pepsine, la tripsine et la chymotrypsine*, Biochim. biophys. Acta, **33**, 10 (1959).
43. P. L. Sawant, I. D. Desai, A. L. Tappel, *Digestive capacity of purified lysosomes*, Biochim. biophys. Acta, **85**, 93 (1964).
44. G. L. Ada, J. M. Williams, *Antigen in tissues. I. State of bacterial flagella in lymph nodes of rats injected with isotopically lebelled flagella*, Immunology, **10**, 417 (1966).

Fig. 1. — Reacţia de identificare parţială dintre albumina fluorescentă iniţială şi albumina prezentă în urină la a 8-a zi de la inocularea ei intraperitoneală (100 mg).

În godeu s-a introdus albumina iniţială, în şanţul de sus serul de iepure anti-albumină şi în cel de jos urina animalului de experienţă.

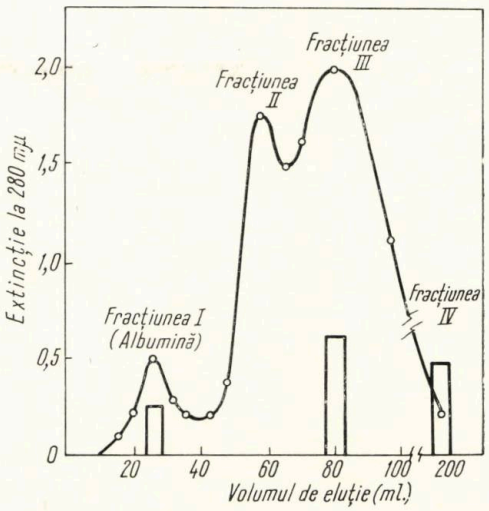


Fig. 2. — Separarea cromatografică pe Sephadex G-50 (coloană de 17/1,7 cm) a urinei de şobolan după injectarea a 100 mg albumină fluorescentă.

Coloanele reprezintă valorile fluorescenţei specifice (galben-portocaliu). Cea de-a doua fracţiune are o fluorescenţă albastră-lăptoasă.

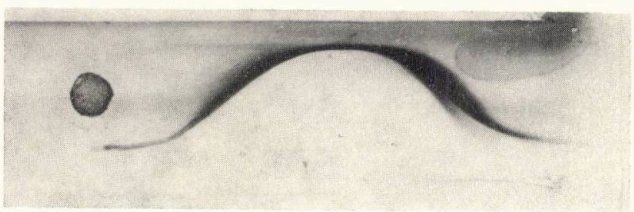


Fig. 3. — Reacţia de identificare totală şi parţială dintre albumina fluorescentă intactă şi albumina prezentă în urină la 2—4 zile de la inoculare şi izolată prin gel-filtrare pe Sephadex G-50.

În godeu s-a introdus albumina intactă, în şanţul de sus serul de iepure antialbumină, iar în cel de jos fracţiunea cromatografică I (concentrată de 5 ori).

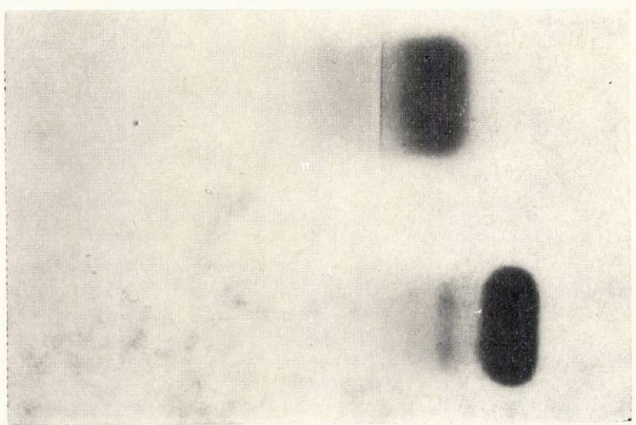
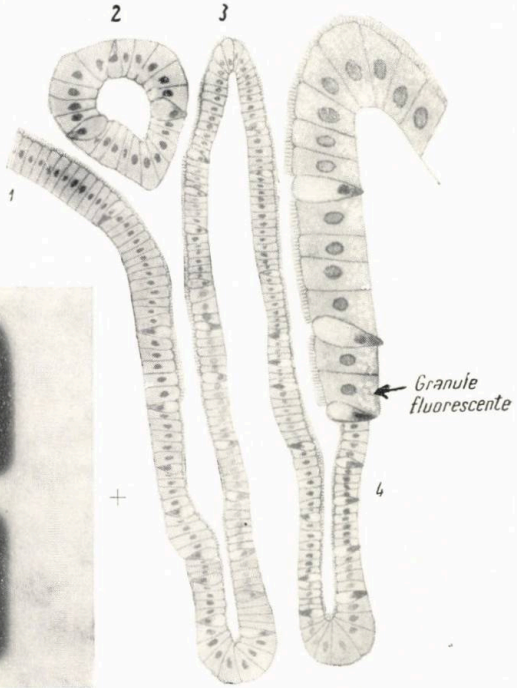


Fig. 4. — Electroforeza proteinelor din urina cobailor injectaţi cu ser de iepure fluorescent.

Proteinele din urină au fost obţinute prin precipitarea cu sulfat de amoniu. Şanţul de sus: proteinele din urină; şanţul de jos: proteine din serul de iepure normal.

Fig. 5. — Schiţa repartizării materialului fluorescent în celulele endoteliale ale intestinului subţire de şobolan injectat cu 300 mg de albumină fluorescentă.

1—4 = vilozităţi intestinale (*2* = în secţiune transversală). În vilozităţile *2* şi *4* se indică poziţia materialului fluorescent în celulele cilindrice. Schiţa este făcută la scară demonstrativă.



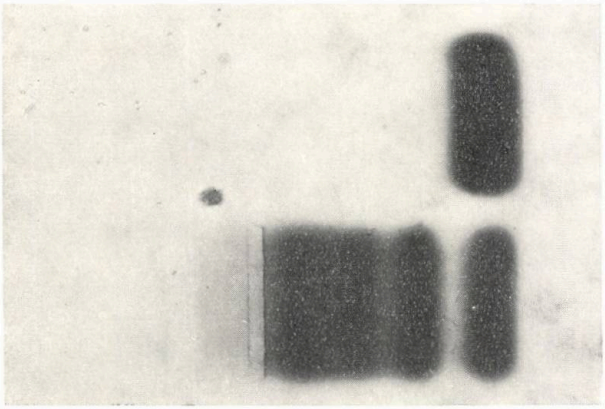


Fig. 6. — Analiza electroforetică a extractului salin de mucoasă intestinală. *Jos* : mucoasă ; *sus* : albumina serică umană fluorescentă.

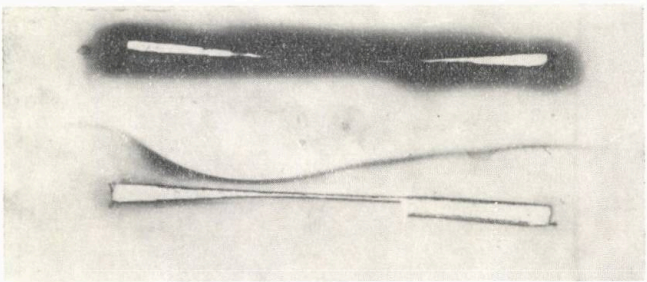


Fig. 7. — Analiza imunoelectroforetică a extractului de mucoasă intestinală. În godeu s-a introdus albumina serică umană fluorescentă, în şanţul de sus extractul salin de mucoasă, iar în cel de jos serul de iepure antialbumină umană.

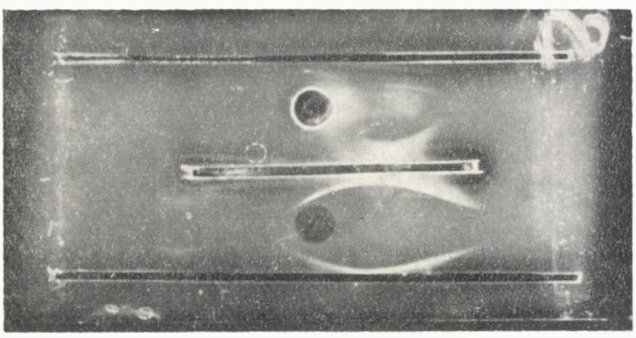


Fig. 8. — Analiza imunoelectroforetică a fracţiunii de 20 000 *g* extrasă cu DOC.

În godeul superior s-a introdus extractul, iar în cel inferior albumina serică umană marcată cu Dansil. În şanţul superior şi inferior s-a introdus ser de cal antiom, iar în şanţul central ser de iepure antialbumină.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 1, 31–34 (1967)

EVOLUȚIA CONȚINUTULUI ÎN ACIZI TARTRIC ȘI MALIC AL STRUGURILOR ÎN TIMPUL CREȘTERII ȘI MATURĂRII

PETRE IONESCU

616.1

Rezumat. — În condițiile podgoriei Drăgășani, se urmărește evoluția acizilor tartric și malic la 5 soiuri de *Vitis vinifera* în timpul creșterii, maturării și supramaturării bacelor. Determinările se fac prin cromatografie pe hîrtie. Se constată că acumularea maximă de acizi organici în bace se realizează după 35 de zile de la scuturarea florii la soiul Regina viilor, și la 55 de zile la soiurile St. Emillion și Cabernet Sauvignon.

Raportul acid tartric/acid malic din bacă, la începutul creșterii bacelor, este în favoarea acidului tartric, apoi trece în favoarea acidului malic, pentru ca la maturare să predomine iar acidul tartric. La supramaturarea bacelor, acidul malic nu se mai evidențiază prin metoda folosită la soiurile Sauvignon, Merlot și Regina viilor, dar are o valoare relativ ridicată la soiurile St. Emillion și Cabernet Sauvignon.

Numeroși cercetători au urmărit evoluția acidității strugurilor în timpul maturării lor. Majoritatea s-au ocupat de evoluția cantitativă a acizilor tartric și malic, precum și a acidității titrabile, în timpul fazei de maturare a strugurilor [1], [4–7], [11] și mai puțin în timpul fazei de creștere a bacelor [2], [3], [10].

Cercetările lui Geisler și Radler [2] au arătat că acumularea acidității merge aproape paralel cu creșterea bacelor și poate fi privită ca o parte a acumulării totale a substanțelor. Maximul este atins în timpul fazei de evoluție, după care urmează scăderea acidității, dar înainte de intrarea în faza de maturare.

S-a găsit [6] că, în timpul maturării bacelor, micșorarea conținutului în acid malic o depășește pe aceea a acidului tartric. Se presupune că micșorarea acidității bacelor nu ar fi condiționată numai de maturarea lor, ci și de dominanța caracterului de creștere luxuriantă a viței de vie ; o parte din aciditatea din bace este translocată în alte organe, o dată cu maturarea lor.

Drawert și colab. [1], lucrînd cu ^{14}C, au observat că o dată cu maturarea strugurilor acidul tartric se transformă în glucoză și fructoză. De asemenea, în procesul de respirație are loc o ardere a acizilor organici, mai intensă în această perioadă.

La noi în țară, cercetările întreprinse în podgoria Copou-Iași [11] au găsit la soiurile studiate că acidul malic participă la aciditatea reală în proporția cea mai mare.

Pentru a cunoaşte cum se desfăşoară evoluţia cantitativă a acizilor tartric şi malic, precum şi a acidităţii titrabile, în timpul perioadei de creştere, maturare şi supramaturare a bacelor, nu numai în funcţie de soi, ci şi de condiţiile climatice ale anului, în podgoria Drăgăşani, s-a făcut această experimentare.

MATERIAL ŞI METODĂ

La Staţiunea viticolă Drăgăşani s-a experimentat cu soiurile St. Emillion, Sauvignon, Cabernet Sauvignon şi Merlot, ca soiuri de structuri pentru vin, şi cu Regina viilor ca soi de struguri pentru masă.

Plantaţia este în vîrstă de 23 de ani şi toate soiurile cercetate sînt altoite pe portaltoiul Riparia Gloire. Recoltarea probelor s-a făcut de la cîte 50 de butuci de fiecare soi, cît mai uniformi şi asemănători.

Recoltarea bacelor s-a făcut în jurul orei 9, atunci cînd erau lipsite de rouă. După cîntărirea probelor, bacele erau spălate cu o soluţie de 1% acid acetic pentru îndepărtarea urmelor de sulfat de cupru, rămase de la stropitul viei.

Soluţia de bază din care urmau să se facă determinările s-a obţinut prin fierberea bacelor pînă la spargerea şi omogenizarea lor.

Determinarea acizilor tartric şi malic s-a făcut prin cromatografie pe hîrtie, după metoda Michaud [8], folosindu-se pentru aprecierea cantitativă compararea cu o scară etalon; dat fiind că metoda cromatografică aplicată este numai orientativă, suma celor doi acizi, apreciată după cromatograme, nu este egală cu aceea aflată prin determinarea titrimetrică.

Pe lîngă acidul malic şi tartric, s-au mai urmărit aciditatea titrabilă şi greutatea medie a unei bace. Cantităţile de acizi tartric şi malic găsite şi aciditatea totală s-au exprimat în funcţie de greutatea unei bace. Ele reprezintă media a trei determinări paralele.

Primele determinări s-au efectuat la circa 6 zile după scuturarea florilor, atunci cînd ovarele fecundate au început să crească, diferenţiindu-se de cele nefecundate, iar după aceea din 10 în 10 zile, pînă la supramaturarea strugurilor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din examinarea rezultatelor obţinute reiese că o dată cu creşterea bacelor are loc o acumulare a acizilor, care atinge un maxim la circa 35-55 de zile de la data scuturării florilor, variind după soi. Astfel, la soiul Regina viilor, maximul acumulării acizilor în bacă se atinge la sfîrşitul lunii iulie, adică după 35 de zile, iar la soiurile St. Emillion şi Cabernet Sauvignon după 55 de zile.

Din figura 2 se constată că, la toate soiurile cercetate, în primele faze de creştere a bacelor, conţinutul în acid malic este inferior conţinutului în acid tartric. Astfel, la 29 iunie, raportul acid tartric/acid malic are valoarea cea mai mare la St. Emillion (0,43 mg/0,08 mg), iar cea mai scăzută la Regina viilor (0,92 mg/0,61 mg). În fazele următoare, cînd o dată cu creşterea bacelor are loc o creştere însemnată a acizilor, ritmul de creştere a acidului malic îl depăşeşte însă pe cel al acidului tartric, astfel că raportul acid tartric/acid malic ajunge să fie în favoarea acidului malic. În faza de acumulare maximă a acidului malic în bace, raportul pe soiuri se prezintă astfel : St.Emillion – 8,5 mg/20,66 mg, Sauvignon – 10,80 mg/16,92 mg,

Cabernet Sauvignon — 16,18 mg/11,84 mg, Merlot — 8,29 mg/16,95 mg, și Regina viilor — 21,28 mg/27,58 mg.

De aici începe perioada de pîrgă a strugurilor, marcată printr-o scădere simțitoare a acidității. Tot acidul malic este acela care are o viteză de scădere mai pronunțată. Rezultatele obținute în această privință concordă cu datele literaturii de specialitate [6], [11], și anume că acidul malic ar servi în respirația bacelor ca substrat și în măsură mai mică ar fi salificat de către baze. Pentru acidul tartric nu se constată o scădere atît de pronunțată, ci oscilații între anumite limite de la un moment la altul al determinărilor. Se pare că acidul tartric din bace variază paralel cu curba temperaturilor active și a insolației, pînă în faza de maturare a strugurilor.

La maturitatea strugurilor, marcată printr-o stagnare a greutății bacelor și a conținutului în zahăr, ce se realizează în jurul datei de 9 septembrie pentru Regina viilor și 19 septembrie pentru celelalte soiuri, raportul acid tartric/acid malic se schimbă din nou în favoarea acidului tartric la soiurile Merlot (10,81 mg/4,81 mg), Sauvignon (12,81 mg/3,49 mg) și Cabernet Sauvignon (9,41 mg/7,52 mg), pe cînd la sourile St. Emillion (4,71 mg/9,42 mg) și Regina viilor (13,01 mg/14,62 mg) raportul este tot în favoarea acidului malic.

În fazele următoare însă, la toate soiurile, acidul malic scade sub valoarea acidului tartric. La supramaturarea soiurilor Merlot, Sauvignon și Regina viilor, acidul malic nu mai poate fi pus în evidență prin metoda cromatografică. În schimb, la St. Emillion și Cabernet Sauvignon, el se menține ridicat. Din acest punct de vedere putem împărți soiurile studiate în : malice (St. Emillion și Cabernet Sauvignon — figura 1) și nemalice (Merlot, Sauvignon și Regina viilor — figura 4). De aceea, la stabilirea momentului optim de recoltare a strugurilor trebuie să se țină cont și de raportul dintre cei doi acizi, de care depinde în bună măsură calitatea vinului obținut [9].

În decada a doua a lunii septembrie s-a înregistrat o ploaie de 16,4 mm (fig. 3), care coincide cu faza de maturare deplină a strugurilor. În urma acestei ploi, aproape toate soiurile au răspuns printr-o ușoară creștere în greutate a bacelor, dar mai ales prin creșterea conținutului în acid tartric. Acest lucru este mai evident la soiurile St. Emillion, Cabernet Sauvignon și Sauvignon. La soiurile Regina Viilor și Merlot, care sînt într-o fază de maturare mai avansată, creșterea acidului tatric este mai mică. La soiul Merlot, precipitațiile scăzute din decada a treia a lunii august par să influențeze mai mult creșterea acidului tartric în bace.

Din aceleași grafice (fig. 2) se constată că evoluția acidului malic nu ar fi influențată de oscilațiile condițiilor climatice, ci probabil este condiționată de procesele fiziologice și biochimice de maturare a semințelor în vederea reproducerii speciei.

Începînd cu pîrga și maturarea bacelor, la unele soiuri, ca Merlot, Cabernet Sauvignon și Sauvignon, conținutul în acid tartric determinat cromatografic depășește aciditatea titrabilă.

Aceasta arată că prin metoda aplicată separarea acizilor este imperfectă, iar aprecierea raportului lor cantitativ trebuie considerată numai orientativă.

CONCLUZII

1. Acumularea maximă de acizi organici în bace se realizează la circa 35—55 de zile de la scuturarea florii, în funcţie de soi.

2. Raportul acid tartric/acid malic în bacă variază cu faza de creştere şi maturare. La începutul creşterii bacelor raportul este în favoarea acidului tartric, apoi trece în favoarea acidului malic, pentru ca la maturare să predomine iar acidul tartric.

3. La supramaturarea strugurilor, acidul malic nu se mai evidenţiază, prin metoda folosită, la soiurile Sauvignon, Merlot şi Regina viilor, are o valoare relativ ridicată la soiurile St. Emillion şi Cabernet Sauvignon.

Prezentat la redacţie la 15 aprilie 1966

Staţiunea experimentală viticolă Drăgăşani

BIBLIOGRAFIE

1. Drawert F., Steffan H., Allmann H., Bachmann O., *Bildung von ^{14}C Glucose und ^{14}C Fructose aus Weinsäure in reifenden Beeren der Rebe*, Naturwissenchaften, **49**, 159—160 (1962).
2. Geisler G., Radler F., *Entwicklungs- und Reifevorgänge an Trauben von Vitis*, Ber. dtsch. bot. Ges., **76**, 4 (1963).
3. Hale C. R., *Synthesis of organic acids in the fruit of the grape*, Nature, **195**, *4 844*, 917 (1962).
4. Korobkina Z. V., *Izmenenie himiceskogo sostava vinograda pri sozrevanii*, Naucin. tr. Samarkandsk cooperativn Tentrosoiuza, **10**, 101—118 (1961).
5. Kozenko M. E., *Dinamika titruemoi kislotnosti v proţese sozrevania vinograda*, Vinod. i vinograd. SSSR, *7*, 7—10 (1062).
6. Liebert P. H., Watenberg H., *Untersuchungen des Wein- und Apfelsäuregehaltes reifender Weinbeeren*, Ber. dtsch. bot. Ges., **78**, 115—121 (1965).
7. Magriso I., *Po vaprosa za neakoi faktori, koito okazvat, vliianie na dinamikata na zaharite i kiselnitie v grozdeto*, Lozar. i vinar, **12**, 22—30 (1963).
8. Michaud J., *Méthode simple de recherche de l'acide malique dans les vins par chromatographie sur papier*, Rev. rom. agric. vitic. arboric. (Lausanne), **15**, 10 (1959).
9. Ribereau-Gayon I., Peynaud E., *Analyse et contrôle des vins*, Paris-Liège, Ed. Lib. Polytech. Ch. Béranger, 1958.
10. Stanimorovik S., Stanimorovik D., Damanski F., *Prilog posnavaju dinamike glucoze, fructoze, jabucne i vinske kiseline u plodu u toku vegetacijske periode, Vitis Vinifera*, J. Biologhiia, **4**, 30 (1963).
11. Tîrdea C., *Dinamica acizilor tartric şi malic în timpul perioadei de maturarea strugurilor la principalele soiuri din podgoria Copou-Iaşi*, Ind. Alim., **15**, 294—299 (1964).

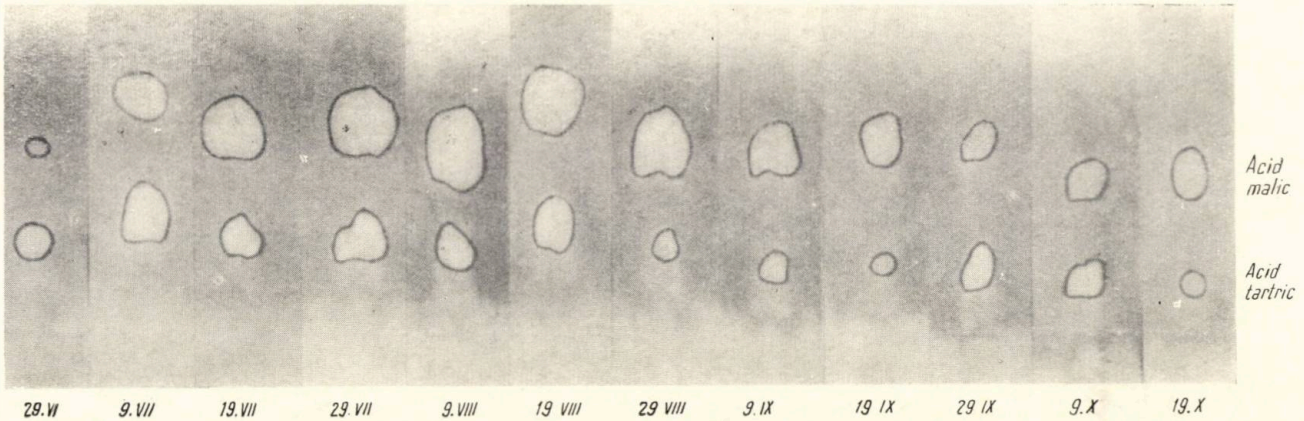


Fig. 1. — Dinamica acizilor tartric și malic din struguri la soiul St. Emillion.

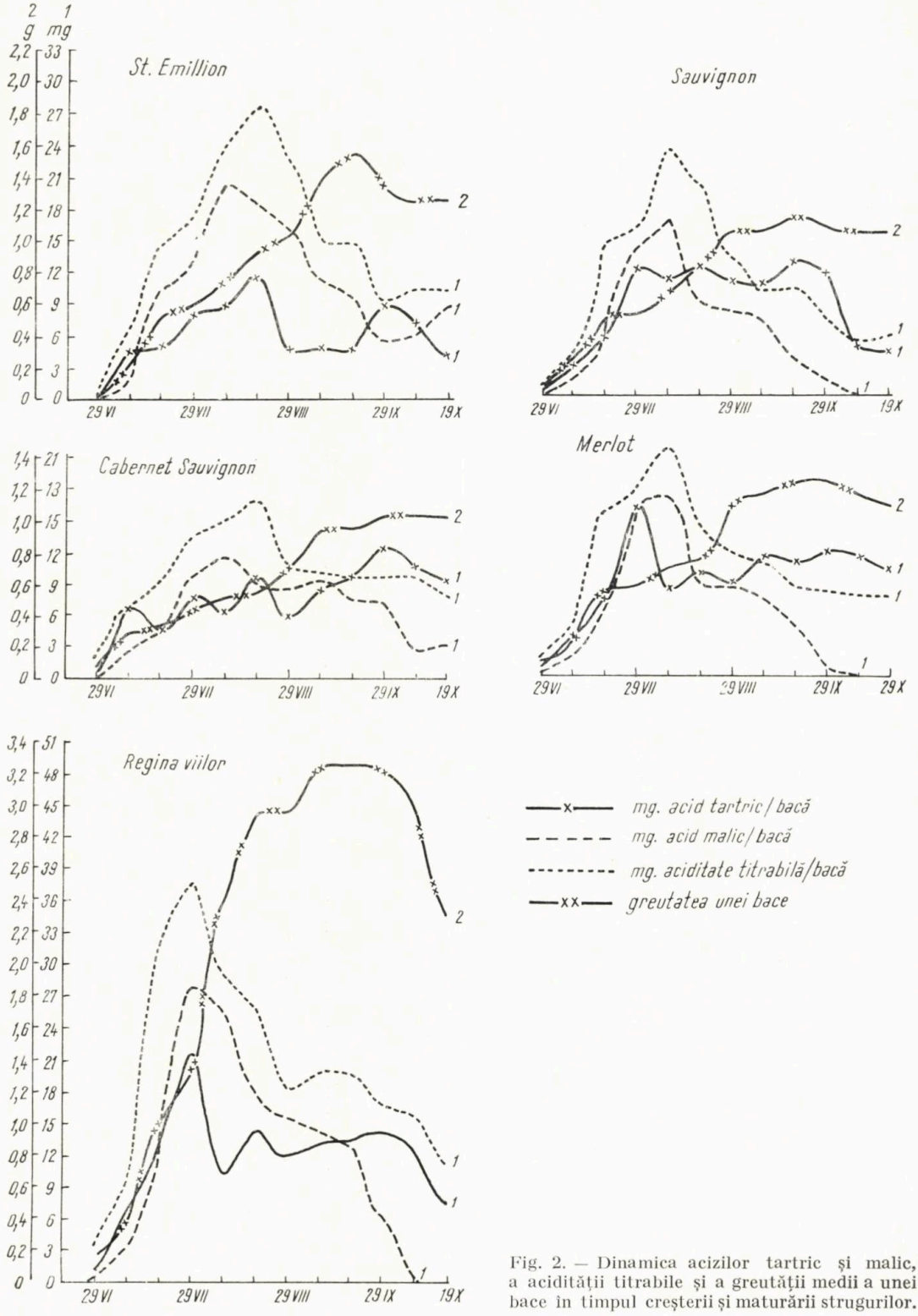


Fig. 2. — Dinamica acizilor tartric şi malic, a acidităţii titrabile şi a greutăţii medii a unei bace în timpul creşterii şi maturării strugurilor.

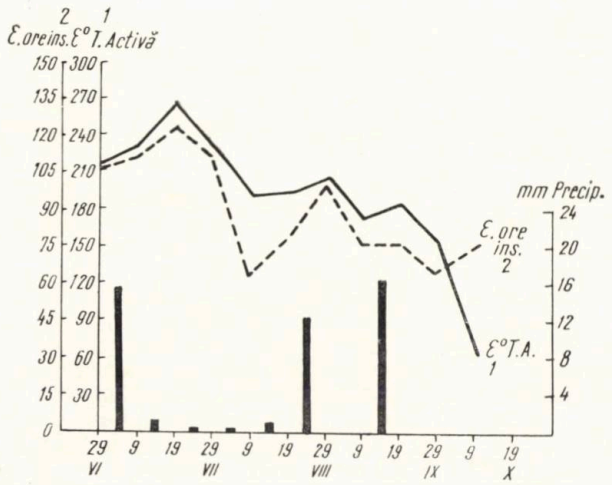


Fig. 3.— Situația climatică.

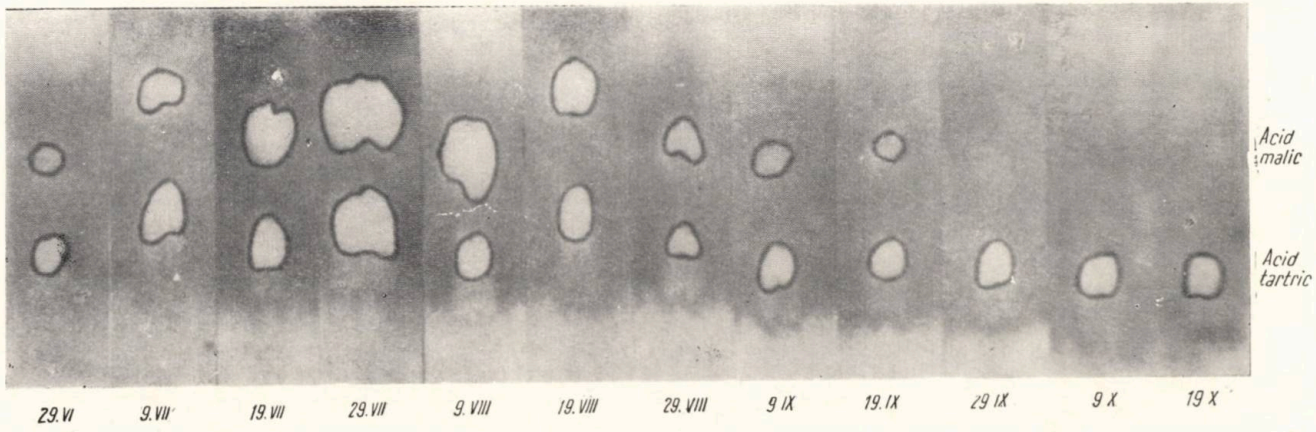


Fig. 4. — Dinamica acizilor tartric și malic din struguri la soiul Merlot.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 1, 35–45 (1967)

CERCETĂRI PRIVIND VALOAREA UNOR TESTE BIOCHIMICE PENTRU OBIECTIVAREA SINDROMULUI DE OBOSEALĂ LA FOŞTII BOLNAVI DE TUBERCULOZĂ REÎNCADRAŢI ÎN MUNCĂ

EUG. PĂUNESCU *

612.577.2

Rezumat. — Pentru aprecierea adaptării la efort a foştilor bolnavi tuberculoşi reîncadraţi, s-a studiat valoarea unor teste biochimice simple — creatininuria şi proba Donaggio — aplicate la persoane sănătoase (din care 83 adaptate la muncă şi 10 neadaptate), precum şi la 67 de perechi de subiecţi (reîncadraţi) şi martori (persoane sănătoase prestînd aceeaşi muncă cu reîncadraţii). Testele au fost aplicate pe urini recoltate înainte şi după perioada de lucru în producţie; rapoartele dintre valorile obţinute, după corectare cu densitatea urinii, au constituit „indici biochimici" de apreciere a gradului de oboseală în procesul de muncă.

Dintre sănătoşii adaptaţi la munca prestată, peste 80% prezintă valori sub 1,2 ale indicilor biochimici, pe cînd 70% dintre neadaptaţii la muncă prezintă valori mult peste 1,2.

Reîncadraţii ce prestează o muncă uşoară se comportă ca şi martorii lor; la muncă medie şi grea însă, peste 20% nu sînt corespunzător adaptaţi la efortul solicitat.

Dintre cei cinci reîncadraţi care au făcut recidive, patru au prezentat valori mari ale indicilor biochimici comparativ cu martorii lor.

Se consideră că asemenea teste biochimice simple — alături de alte metode — pot fi folosite pentru urmărire, la locul de muncă, a sindromului de oboseală la foştii tuberculoşi reîncadraţi.

Una din probele principale care se pun în cazul reîncadrării în muncă a unui fost bolnav de tuberculoză este felul cum organismul acestuia reacţionează la efortul fizic necesitat de travaliul prestat la locul de muncă în care a fost reîncadrat. Acest efort fizic se traduce, în final, printr-un „sindrom de oboseală", care poate fi mai mult sau mai puţin accentuat, în funcţie de gradul de adaptare a organismului la efortul prestat.

Pentru aprecierea gradului de oboseală fizică, există în prezent o serie de teste biochimice [1], printre care :

a) teste biochimice bazate pe determinarea gradului de solicitare a corticosuprarenalei ; printre aceste teste se numără dozarea *17*-cetosteroizilor

---

* Asistenţă tehnică — Angela Răsoiu.

și a hidroxisteroizilor, dozarea uropepsinei (a cărei secreție este coordonată prin intermediul cortexului suprarenal) etc. ;

b) teste biochimice bazate pe determinarea concentrației urinare a unor produși ai metabolismului proteic ; în acest sens, dozarea creatininuriei sau a unui mucopeptid care dă complexe solubile cu unii coloranți azoici este preconizată ca test de investigație a gradului de oboseală ;

c) teste biochimice bazate pe dozarea conținutului seric în acid ascorbic (vitamină C), înainte și după efort, sau pe determinarea echilibrului acido-bazic sanguin în asemenea condiții etc.

În vederea alegerii unor teste biochimice pentru obiectivarea sindromului biologic de oboseală la foștii bolnavi de tuberculoză, în lucrarea de față s-a pornit de la premisa că aceste teste trebuie să poată fi aplicate la locul de muncă. Totodată, ele trebuie să fie „ușor de acceptat" atît din partea subiectului testat, cît și din partea laboratorului care execută testarea ; de asemenea, ele trebuie să permită aprecierea modificărilor biochimice care pot surveni în cursul perioadei de lucru (pe o durată medie de 8 ore).

Pentru aceste motive, nu s-a recurs la testele de investigare a funcției corticosuprarenalei sau la cele care apreciază această funcție pe cale indirectă (uropepsina), deoarece modificările acestei funcții sînt apreciabile abia de-a lungul unei perioade de 24 de ore, ceea ce nu corespunde condițiilor de investigație la locul de muncă ; de asemenea, aceste teste sînt greu accesibile unui laborator de rutină, deoarece necesită reactivi și aparatură speciale.

Testul de apreciere a conținutului seric în acid ascorbic poate constitui, în principiu, o modalitate de apreciere fidelă a intensității unui efort fizic, cunoscut fiind că solicitarea fizică a unui organism neadaptat duce la un consum proporțional de vitamină C. Din păcate, variațiile concentrației sanguine de acid ascorbic sînt supuse nemijlocit fluctuațiilor alimentare, fapt care complică mult condițiile de aplicare a testului pentru studiul sindromului de oboseală la foștii bolnavi de tuberculoză reîncadrați în muncă, deoarece ar fi necesară respectarea cu strictețe a unui anumit regim alimentar. Impunerea unui regim alimentar cu limitarea aportului de vitamină C poate crea însă condiții nefiziologice, care să falsifice într-o anumită măsură răspunsul organismului testat la efortul solicitat la locul de muncă. Pe lîngă aceste inconveniente, încercarea de a aplica testul acidului ascorbic pentru aprecierea sindromului de oboseală la fostul tuberculos este limitată și de alte greutăți, printre care necesitatea unei aparaturi adecvate pentru efectuarea testării și împotrivirea obișnuită a subiecților de testat la cererea de a li se preleva mai multe prize de sînge.

Pentru aceste motive, în vederea evaluării pe cale biochimică a sindromului de oboseală la foștii tuberculoși reîncadrați în muncă, am preferat utilizarea testelor de dozare a concentrației urinare de produși ai metabolismului proteic, și anume : *dozarea creatininuriei și reacția semicantitativă Donaggio*. Întrucît pentru executarea acestor teste este nevoie numai de urină, subiectul, nefiind supus unei prelevări de sînge, acceptă de obicei cu ușurință investigația. Pe de altă parte, efectuarea acestor analize este accesibilă chiar la nivelul laboratoarelor mai slab utilizate, ceea ce constituie un avantaj important.

MATERIAL ŞI METODĂ

Dozarea creatininei în urină s-a efectuat după metoda descrisă de O. Folin (citat după [2]), utilizînd pentru aprecierea rezultatelor fotocolorimetrul tip Pulfrich. Cu această metodă, valorile normale se situează între 1,2 şi 1,5 g creatinină în urina de 24 de ore.

Eliminarea renală a creatininei este în directă dependenţă de intensitatea catabolismului proteic. Hipercreatininuriile sînt prezente — fiziologic — în eforturile musculare intense şi ca urmare a unui regim alimentar bogat în proteine. De asemenea — patologic — , hipercreatininuria se decelează în procesele de atrofie musculară, în febrele prelungite (tifos exantematic, pneumonie etc.), precum şi în unele forme de insuficienţă renală sau hepatică.

Pentru dozarea creatininei în urină a fost folosită următoarea tehnică :

Reactivi

1) Acid picric 1,2 % (soluţie saturată : se dizolvă la cald, se lasă pînă a doua zi pentru răcire şi apoi se filtrează prin hîrtie de filtru).

2) Soluţie de hidroxid de sodiu 10 %.

Tehnica reacţiei

Proba de urină se diluează 1/100 cu apă distilată. Din diluţie sau iau 3 ml într-o eprubetă şi se adaugă 9 ml acid picric 1,2 %. Eprubeta se lasă 1 min în baie cu apă la fierbere, apoi se răceşte, iar conţinutul se filtrează. Din filtrat se iau 10 ml şi se adaugă 0,6 ml soluţie NaOH 10 %. Se agită bine şi se lasă 20 min în repaus.

În paralel se face o probă martor, în aceleaşi condiţii ca mai sus, cu singura deosebire că, în loc de 3 ml urină, se iau 3 ml apă distilată.

Rezultatele se citesc la fotocolorimetrul tip Pulfrich, folosindu-se cuva de 30 mm şi filtrul verde S_{53} ; lectura probei cu urină se face contra probei martor (cu apă distilată). Extincţia citită se converteşte în concentraţii de creatinină pe o curbă etalon, construită cu ajutorul unor reacţii similare, în care însă, în loc de urină, se introduc soluţii de creatinină cu concentraţii cunoscute (în lipsa creatininei se poate folosi o soluţie etalon de bicromat de potasiu 0,5 N, a cărei culoare este echivalentă cu aceea a unei soluţii de creatinină cu concentraţie de 2 mg /100 ml).

Reacţia semicantitativă Donaggio [3] a fost propusă ca test de apreciere a gradului de oboseală încă din 1933 şi are ca principiu împiedicarea precipitării unui colorant (tionină sau albastru de toluidină) [4], adăugat la urină, atunci cînd aceasta conţine o cantitate mai importantă dintr-un mucopeptid ; acest mucopeptid se găseşte normal în urină, în cantităţi reduse, are o greutate moleculară de 30 000 şi este constituit din galactoză, un acetil-aminoglucid, fucoză, manoză, glucoză, acid uronic şi 14 aminoacizi.

Eliminarea renală a mucopeptidului decelabil prin reacţia Donaggio este rezultatul proceselor catabolice care privesc substanţa fundamentală din ţesutul conjunctiv. Valorile renale sînt direct proporţionale cu concentraţiile sanguine din acele glucoproteine care migrează electroforetic, în special cu α-globulinele serice (orosomucoizii sau factorul MP_1 descris de Winzler şi α_1-seromucoizii descrişi de Jayle).

Determinarea concentraţiei de mucopeptid urinar se poate face printr-o metodă simplă, semicantitativă, descrisă de Bugard [4]. După această metodă, valorile normale variază cu condiţia fiziologică în care se află subiectul testat ; astfel, valoarea normală este de 100 mg/urina de 24 de ore în cazul repausului la pat şi 150—200 mg/urina de 24 de ore în cazul unui lucru obişnuit, care nu oboseşte.

Mucopeptidele urinare au valori crescute într-o serie de afecțiuni ale rinichiului (cu permeabilitate renală crescută), în afecțiunile inflamatorii (de tipul reumatismului evolutiv),în afecțiunile febrile benigne (gripă) sau grave (tuberculoză), în cancer și în alte distrucții tisulare întinse (arsuri, infarct). Fiziologic, reacția Donaggio dă valori mari în eforturile musculare masive.

Pentru realizarea testului de „obstacol urinar", propus de Donaggio, s-a utilizat următoarea tehnică :

Reactivi

1) Soluție 4% de molibdat de amoniu, ușor acidifiat (se adaugă 0,15 ml acid clorhidric concentrat pentru fiecare 100 ml soluție de molibdat).

2) Soluții apoase de albastru de toluidină, în diluțiile 1/4 000, 1/3 000, 1/2 000, 1/1 500, 1/1 000 și 1/500.

Tehnica reacției

Urina de testat (aproximativ 15 ml) se acidulează cu 0,2 ml acid acetic glacial, se ține în baie cu apă clocotită timp de 5—6 min, se răcește și se filtrează.

Într-o serie de 6 eprubete de 16/160 mm se repartizează cîte 2 ml din urina acidulată și filtrată ; în fiecare eprubetă se adaugă cîte 1 ml din diluțiile sus-menționate de albastru de toluidină și, apoi, în toate eprubetele, cîte 2 ml soluție de molibdat. Seria de eprubete va avea deci următorul conținut :

Eprubeta nr.	*Urină*	*Sol. albastru de toluidină*	*Sol. de molibdat*
1	2 ml	1 ml 1/4 000	2 ml
2	2 ml	1 ml 1/3 000	2 ml
3	2 ml	1 ml 1/2 000	2 ml
4	2 ml	1 ml 1/1 500	2 ml
5	2 ml	1 ml 1/1 000	2 ml
6	2 ml	1 ml 1/500	2 ml

Eprubetele se agită și se lasă în stativ, peste noapte, la întuneric. A doua zi se identifică eprubetele în care a avut loc sedimentarea colorantului ; în aceste eprubete reacția este *negativă*.

Cantitatea de mucopeptid existentă în urina de test, în funcție de numărul eprubetelor în care a avut loc precipitarea, este următoarea :

50 mg/100 ml urină cînd în toate cele 6 eprubete a avut loc sedimentarea
85 mg/100 „ „ „ „ ultimele 5 „ „ „ „ „
140—175 mg/100 „ „ „ „ „ 4 „ „ „ „ „
200—250 mg/100 „ „ „ „ „ 3 „ „ „ „ „
300—350 mg/100 „ „ „ „ „ 2 „ „ „ „ „
400—600 mg/100 „ „ „ numai ultima eprubetă prezintă sedimentare
peste 600 mg/100 „ „ „ în nici o eprubetă nu a avut loc sedimentarea.

Cele două teste preconizate pentru investigațiile de rutină privind obiectivarea sindromului biologic de oboseală—dozarea creatininuriei și proba Donaggio—reflectă în mod direct variațiile de metabolism proteic, fiind deci influențabile de starea de funcțiune a ficatului și

de regimul alimentar, precum şi, în final, de integritatea funcţiei renale. O investigaţie riguroasă cu ajutorul acestor teste ar presupune deci precizarea *condiţiilor optime* de testare, în care scop ar fi necesar:

a) să se facă o investigaţie clinică prealabilă completă;

b) să se facă o investigaţie de laborator pentru funcţiile renală (*clearance*) şi hepatică (disproteinemie);

c) să se administreze subiectului de testat, cu 2-3 zile înainte de efectuarea probei, un regim proteic adecvat (60—80 g proteină/zi).

Asemenea investigaţii nefiind posibile în cazul unor testări de rutină, se impune găsirea unei metodologii adecvate, care să permită renunţarea la atare investigaţii, fără a aduce prejudicii fidelităţii rezultatelor obţinute.

Pe de altă parte, cum în cadrul cercetărilor întreprinse testul urma să fie aplicat numai pe o perioadă redusă de timp, şi anume în cele 8 ore în care subiectul testat este supus efortului solicitat la locul său de muncă, probele de urină pe care s-au efectuat testările au fost recoltate de la subiecţi în aceeaşi zi, înainte de intrarea în producţie şi la sfîrşitul acestei perioade, iar semnificaţia valorilor obţinute s-a apreciat după raportul dintre valoarea de la sfîrşitul perioadei de muncă şi cea dinaintea începerii muncii.

Avînd în vedere faptul că valorile creatininuriei şi mucopolizaharidului urinar sînt în funcţie şi de capacitatea de concentrare renală, în stabilirea raportului sus-menţionat s-a luat în consideraţie şi densitatea probelor de urină folosite.

În felul acesta, pentru aprecierea modificărilor survenite s-au calculat rapoartele dintre valorile creatininuriei şi probei Donaggio la sfîrşitul şi la începutul perioadei de producţie, ţinîndu-se seama de concentraţia urinii supusă testării. În acest sens, am folosit o serie de indici biochimici, rezultaţi din următoarele formule:

1) Variaţia (indicele) creatininuriei: $\theta_C = \frac{di \cdot Ce}{de \cdot Ci}$

2) Variaţia (indi ele) probei Donaggio: $\theta_D = \frac{di \cdot De}{de \cdot Di}$

3) Suma variaţiei (indicilor) ambelor teste: $\theta_T = \frac{di \cdot (Ce + De)}{de \cdot (Ci + Di)}$

unde di = densitatea urinii iniţiale (la intrarea în producţie);
de = densitatea urinii după efort (la sfîrşitul activităţii de producţie);
Ci = creatininuria iniţială;
Ce = creatininuria după efort;
Di = valoarea iniţială a testului Donaggio;
De = valoarea testului Donaggio după efort.

În cazul cînd organismul este perfect adaptat la efortul la care este supus, valoarea acestor rapoarte trebuie să fie egală cu unitatea sau chiar subunitară.

În schimb, cu cît adaptarea organismului la efort este mai slabă, mai incompletă, cu atît valoarea rapoartelor sus-menţionate trebuie să fie mai mare decît unitatea.

Cercetarea întreprinsă a cuprins două etape:

1) Investigarea la locul de muncă a unui lot de *persoane sănătoase*, cu scopul de a preciza fidelitatea testelor utilizate şi în special pe aceea a modului de exprimare a rezultatelor obţinute cu ajutorul formulelor sus-menţionate. De asemenea, investigaţiile efectuate la persoane sănătoase au avut drept scop şi aprecierea gradului de „oboseală fiziologică", în-

ţelegînd prin aceasta oboseala obişnuită, pe care în mod normal o manifestă — după 8 ore de muncă — orice persoană ce depune un efort în munca la care este bine adaptată.

2) Investigarea la locul de muncă a unor *foşti bolnavi de tuberculoză reîncadraţi* în producţie. La aceştia s-au urmărit trei aspecte : *a*) valoarea testelor aplicate la o primă determinare ; *b*) valoarea testelor aplicate după două determinări, la 6 luni interval ; *c*) valoarea testelor aplicate în funcţie de cazurile ce au prezentat recidivă a bolii.

Pentru aprecierea aspectelor metabolice de „oboseală" la reîncadraţii foşti bolnavi de tuberculoză, modificările biochimice urinare testate s-au urmărit, în paralel, la perechi de *subiecţi* (foşti bolnavi) şi *martori* (persoane care îndeplinesc aceeaşi muncă, în condiţii similare, dar care nu au avut tuberculoză în trecut).

Pentru interpretarea rezultatelor s-a ţinut seama de tipul de muncă desfăşurat pe locul de producţie, stabilit după criteriile secţiei de protecţia muncii (profesiogramă).

REZULTATE

Investigaţii efectuate la persoane sănătoase

Testele creatininuriei şi Donaggio au fost aplicate la un total de 93 de persoane sănătoase, care nu au avut în trecut tuberculoză şi nici nu au manifestat în ultimele luni vreo afecţiune acută, cu atingere pulmonară, hepatică sau renală. Dintre acestea :

a) *83 de persoane* au fost testate înainte şi după o activitate de 8 ore în cursul cărora au depus un efort de intensitate medie (asistenţă în clinică, activitate de laborator etc.), cu care erau obişnuite ; acest grup a fost considerat *grupul persoanelor sănătoase şi adaptate la efortul prestat* ;

b) *10 persoane* au fost testate înainte şi după o activitate de 8 ore în cursul cărora au depus un efort de intensitate mare (căratul zăpezii în aer liber, în condiţii de temperatură scăzută) ; aceste persoane efectuau în mod curent eforturi fizice, însă de intensitate mai mică şi într-un climat cu temperatură acceptabilă. Acest grup a fost considerat *grupul persoanelor sănătoase, dar neadaptate la efortul prestat.*

Rezultatele investigaţiilor efectuate la aceste grupe de persoane sînt prezentate în tabelele 1 şi 2, din care se observă că :

Tabela 1

Valorile indicilor biochimici la persoanele sănătoase şi adaptate la efortul prestat

Indici	Persoane cu valori ale indicilor biochimici între					
	pînă la 1,0	1,1 şi 1,2	1,21 şi 1,3	1,31 şi 1,4	1,41 şi 1,8	1,81 şi 2
Creatininurie θ_C	54 (65,1 %)	17 (20,5 %)	3 (3,6 %)	5 (6 %)	3 (3,6 %)	1 (1,2 %)
Testul Donaggio θ_D	63 (75,8 %)	3 (3,6 %)	2 (2,4 %)	9 (11 %)	4 (4,8 %)	2 (2,4 %)
Totali θ_T (creatinină şi Donaggio)	58 (69,9 %)	10 (12,1 %)	5 (6 %)	6 (7,2 %)	4 (4,8 %)	0 (0 %)

Tabela 2

Valorile indicilor biochimici la persoanele sănătoase, dar neadaptate la efortul prestat

Indici	Persoane cu valori ale indicilor biochimici între						
	pînă la 1,0	1,1 şi 1,2	1,21 şi 1,3	1,31 şi 1,4	1,41 şi 1,8	1,81 şi 2	peste 2
Creatininurie θ_C	3 (30 %)	—	—	—	2 (20 %)	1 (10 %)	4 (40 %)
Testul Donaggio θ_D	3 (30 %)	—	—	3 (30 %)	—	1 (10 %)	3 (30 %)
Totali θ_T (creatinină şi Donaggio)	3 (30 %)	—	—	—	3 (30 %)	1 (10 %)	3 (30 %)

a) *La persoanele sănătoase şi adaptate la efortul prestat* (tabela 1), mai mult de 4/5 (adică 85,6, 79,4 şi 82 %) prezintă valori ale indicilor creatininuriei, Donaggio şi, respectiv, totali pînă la 1,2. Această valoare poate fi deci considerată ca marcînd pragul teoretic al adaptabilităţii la efortul prestat.

Se remarcă la acest grup (tabela 1) că cele mai numeroase valori pînă la 1,2—adică acelea care pot obiectiva un grad de oboseală minimă, „fiziologică" — sînt date de indicele creatininuriei (71 dintre subiecţi din totalul de 83 testaţi, adică 85,6 %, prezintă indicele creatininuriei sub 1,2). Acest lucru pare să indice o mai mare sensibilitate a testului creatininuriei. De asemenea, valori pînă la 1,2 ale indicelui „total" (suma variaţiei creatininuriei şi Donaggio) se întîlnesc la un număr mare de subiecţi testaţi (68 din 83, adică 82 %), ceea ce permite să considerăm şi acest indice ca suficient de sensibil, dacă se ţine seama că metoda preconizată trebuie să fie aplicată ca test orientativ, de rutină.

b) *La persoanele sănătoase, dar neadaptate la efortul prestat* (tabela 2), numai o proporţie de 30 % (3 din 10) prezintă valori teoretic normale ale indicilor biochimici testaţi : creatininurie, Donaggio şi θ T (suma indicilor). Restul de 70 % prezintă—pentru toţi aceşti trei indici biochimici — valori mult crescute, predominînd cele peste 2 (30—40 % din totalul testaţilor). Aceste valori, care depăşesc mult pragul „fiziologic" de 1,2, exprimă gradul avansat de oboseală al testaţilor, ca rezultat al neadaptării lor la munca prestată.

Deci, în condiţiile prevăzute de testare, se poate considera că testele biochimice utilizate pot aprecia — pe ansamblu — în mod satisfăcător sindromul de oboseală la efort fizic, evidenţiind cu multă claritate peste 2/3 (70 %) din cazurile ce manifestă neadaptare la efortul prestat.

Investigaţii efectuate la foştii tuberculoşi reîncadraţi în muncă

Testele biochimice alese pentru investigaţie au fost aplicate la un număr de *67 de perechi de subiecţi* (foşti bolnavi reîncadraţi) *şi martori* (sănătoşi prestînd aceeaşi activitate profesională), care aveau profesiogramă comună.

Rezultatele obținute la aceste perechi de subiecți (S.) și martori (M.) au fost grupate după tipul de muncă desfășurat la locul de producție (muncă ușoară, medie și grea), iar pentru interpretarea rezultatelor s-a considerat utilă folosirea pragului valoric de 1,2 al indicelui „T" (suma variației creatininuriei și testului Donaggio în cursul celor 8 ore de muncă). În funcție de această valoare, au fost considerați ca *normali* (bine adaptați) toți testații care prezintă valori sub 1,2 ale indicelui „T" și au fost etichetați ca *obosind* în procesul de muncă (insuficient adaptați) toți testații care prezintă valori ale indicelui „T" peste 1,2.

Rezultatele obținute sînt redate în tabela 3.

Tabela 3

Modificări metabolice la cele 67 de perechi cu profesiogramă comună

Tipul de muncă	M. și S. normali (*I*)	M. și S. obosesc (*II*)	M. normal, S. obosește (*III*)	M. obosește, S. normal (*IV*)	Diferențe *III*—*IV* (*V*)
Muncă ușoară (20 perechi)	10 (50%)	2 (10%)	4 (20%)	4 (20%)	0
Muncă medie (36 perechi)	9 (25%)	8 (22,2%)	14 (37,8%)	6 (15%)	8 (22,2%)
Muncă grea (11 perechi)	5 (45%)	1 (9,3%)	4 (36%)	1 (9,3%)	3 (26,7%)
Total	24 (36%)	11 (15,4%)	22 (32,8%)	10 (14,8%)	12 (18%)

După cum se observă din această tabelă, din totalul de 67 de perechi, 35 (52,4%) reacționează în procesul de muncă în mod similar. Alte 10 perechi (14,8%) (coloana *IV*) prezintă o oboseală accentuată a martorului și o bună adaptare la procesul de muncă a subiectului; în ansamblu, această categorie poate fi comparată și compensată cu categoria din coloana *III*, în care subiectul se prezintă ca neadaptat, iar martorul ca adaptat. Dacă se acceptă această „compensare" a modului de comportare a perechilor, atunci diferența dintre aceste categorii (coloanele *III* și *IV*) poate fi considerată ca reprezentînd acele cazuri în care subiectul (fostul bolnav de tuberculoză) nu este adaptat la efortul solicitat de procesul de muncă. După cum se observă din tabela 3, valoarea acestei diferențe (coloana *V*), raportată la numărul total al perechilor testate, este de 18%, arătînd că *18% din totalul reîncadraților prezintă în mod evident o deficiență în adaptarea la efort, solicitată de procesul de muncă.*

Analiza rezultatelor la perechile testate, în funcție de tipul de muncă prestat (tabela 3), scoate în evidență două fapte importante:

a) *În cadrul categoriei de muncă ușoară nu există nici un fel de deosebire între martori și subiecții reîncadrați* (de remarcat că 50% din perechi nu dau nici un semn prezumtiv de oboseală în timpul lucrului).

b) *În categoriile de muncă medie și grea se observă o prevalență netă (22 și 26,7%) a subiecților care dau semne prezumtive de oboseală*, spre deosebire de martorii lor, care nu prezintă asemenea semne.

Aceste observații tind să reliefeze faptul că — pentru fostul bolnav de tuberculoză reîncadrat în muncă — adaptarea la efort este simplă în cazul activităților din categoria „muncă ușoară". Această adaptare este însă mult mai dificilă — pentru 1/4 din foștii bolnavi — în cazul reîncadrării lor în categoriile de „muncă medie" și, mai ales, „muncă grea".

La un număr redus de martori (10) și subiecți (13) dintre cei supuși testărilor inițiale s-au efectuat retestări biochimice la un intreval de 6 luni de la prima testare (moment care s-a încadrat în primele 9-11 luni de la reintegrarea în muncă a fostului bolnav). Valorile indicilor biochimici obținute la cele două testări consecutive au fost comparate între ele și rezultatele obținute sînt prezentate în tabela 4. După cum se observă din această tabelă, *o proporție de 62% din reîncadrați prezintă — la retestare — o accentuare a semnelor de oboseală*, în timp ce la martori numai 50 % prezintă o asemenea accentuare a semnelor biochimice prezumtive de oboseală.

Tabela 4

Rezultatele testărilor biochimice repetate la interval de circa 6 luni

Testarea la	Total testați	Valorile indicilor biochimici după retestare		
		valori mai scăzute (= adaptare)	valori staționare	valori mai crescute (= oboseală)
Martori	10	2 (20%)	3 (30%)	5 (50%)
Reîncadrați	13	4 (31%)	1 (7%)	8 (62%)

Aceste rezultate arată că fostul bolnav de tuberculoză, proaspăt reîncadrat în procesul de muncă, prezintă o adaptabilitate mai redusă.

O asemenea adaptabilitate limitată a unora dintre foștii tuberculoși reiese de altfel și din analiza rezultatelor testărilor biochimice efectuate la cinci din perechile testate, ai căror subiecți — în decursul celor doi ani de investigare — au făcut recidivă tuberculoasă. După cum se remarcă din tabela 5, patru din cei cinci subiecți care au făcut recidivă prezentaseră

Tabela 5

Valorile indicilor biochimici urinari la 5 reîncadrați care au făcut recidivă, comparativ cu martorii

Perechea nr.	Calitatea	θ_C	θ_D	θ_T
1	Martor	1,33	0,99	1,30
	Reîncadrat	1,33	2,04	1,59
2	Martor	0,99	1,22	1,14
	Reîncadrat	1,10	1,44	1,27
3	Martor	0,90	0,75	0,81
	Reîncadrat	1,53	1,44	1,48
4	Martor	1,21	0,81	0,99
	Reîncadrat	0,74	0,45	0,55
5	Martor	0,74	0,54	0,66
	Reîncadrat	1,34	1,42	1,38
Valori medii	Martori	1,05	0,86	0,97
	Recidive	1,21	1,36	1,25

valori ale indicilor θ_C, θ_D și θ_T net mai mari decît ale martorilor, iar media globală a valorilor celor trei indici biochimici este de asemenea net mai crescută decît la subiecți.

Aceste cifre confirmă prezumția că testele biochimice utilizate au capacitatea de a obiectiva —în circa 80 % din cazuri— un sindrom biologic de oboseală, care se poate însoți de o rupere a echilibrului biologic al organismului și de o revenire la starea de boală.

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Reîncadrarea socială a foștilor bolnavi de tuberculoză ridică o serie de probleme complexe [5], printre care o importantă pondere revine celor de ordin social, economic, vocațional și, în final, psihologic [6]. Sub aspectul reîncadrării în muncă, problema majoră o constituie capacitatea organismului fostului bolnav de a se adapta la efortul solicitat în procesul de producție. Aprecierea răspunsului organismului la acest efort devine astfel deosebit de utilă atît în vederea asigurării unui loc de muncă corespunzător cu profilul fizic și vocațional al reîncadratului, cît și în vederea asigurării unui control periodic al procesului de adaptare la efort.

Dintre testele de evidențiere a răspunsului unui organism la efort, cele biochimice sînt mult folosite pentru aprecierea adaptării la efort fizic a sportivilor de performanță [1], [7]. Asemenea teste — cu anumite modificări adecvate — pot fi preluate în vederea utilizării lor pentru aprecierea adaptării la efortul fizic solicitat în procesul de muncă organismului unui bolnav de tuberculoză reîncadrat în producție.

Este, desigur, evident — și trebuie subliniat încă o dată — că asemenea teste nu pot da nici o referință specifică pentru procesul tuberculos, privind gradul său de stabilizare sau de reactivare. Aceste teste pot, în principiu, să semnaleze numai existența unui răspuns neadecvat la efortul fizic și deci existența unei insuficiente adaptări la procesul de producție, situație care — în final —, prin acumulare, poate contribui la crearea condițiilor patologice de declanșare a unei recidive într-un organism care prezintă un proces tuberculos stabilizat.

Dintre testele biochimice care pot fi utilizate pentru aprecierea adaptării la efortul solicitat în procesul de producție, determinarea creatininuriei și testul semicantitativ Donaggio au avantajul de a fi ușor de executat și accesibile subiectului de testat. Pentru folosirea acestor teste în vederea obiectivării sindromului de oboseală la reîncadrați, s-a folosit un model de investigație constînd din aplicarea acestor teste la urinile prelevate de la subiecți înainte și după perioada de lucru în producție (8 ore). Raportele dintre cele două valori obținute, după corectarea lor cu valoarea densității urinii, au constituit „indici biochimici" (θ_C, θ_D și θ_T) se apreciere a gradului de oboseală survenită în cursul procesului de muncă.

Aplicarea acestor teste la 83 de persoane sănătoase și considerate adaptate la munca prestată a arătat că, după 8 ore de muncă, peste 80 % prezintă valori sub 1,2 ale indicilor biochimici ; dintre alte 10 persoane sănătoase, dar neadaptate la munca prestată, 70 % prezentau valori ale indicilor mult peste 1,2. Aceasta denotă că, în ansamblu, testele preconizate sînt satisfăcătoare. De asemenea, rezultă că valorile indicilor biochimici pînă

la 1,2 pot fi considerate ca obiectivînd o oboseală normală, în limitele unui efort fizic la care perscana supusă testării este adaptată. În schimb, valorile peste 1,2 pot fi considerate că semnalează neadaptarea la efortul prestat, între gradul de oboseală și valoarea indicilor biochimici existînd un raport direct proporțional.

Investigarea a 67 de perechi (reîncadrați și martori) cu profesiogramă comună a arătat că reîncadrații ce prestează muncă ușoară se adaptează bine în producție, în timp ce peste 20 % din reîncadrații în munca medie sau grea nu prezintă o adaptare corespunzătoare la efortul solicitat. Din acest lot, cinci tuberculoși au făcut recidivă la 1-2 ani de la reîncadrare, și patru dintre aceștia au prezentat valori crescute ale indicilor biochimici comparativ cu martorii lor sănătoși.

În concluzie :

1. Testele biochimice de determinare a creatininuriei și proba semicantitativă Donaggio pot fi utilizate — alături de alte metode de investigație — pentru urmărirea de rutină, la locul de muncă, a sindromului de oboseală la foștii bolnavi tuberculoși reîncadrați.

2. Aceste teste bochimice sînt suficient de fidele pentru a procura informații globale asupra sindromului de oboseală la foștii bolnavi de tuberculoză reîncadrați în muncă. Este de reținut că ele sînt ușor de executat, chiar la nivelul laboratoarelor mediocru dotate cu aparatură, și că se execută pe urină, subiectul testat nefiind solicitat pentru prelevări de sînge.

Prezentată la redacție la 9 martie 1966

Laboratorul de biochimie și fiziologie bacteriană al Institutului clinic de ftiziologie, București

BIBLIOGRAFIE

1. Bugard P., *La fatigue. Physiologie, psychologie et médecine sociale*, Paris, Masson et Cie, 1960.
2. Georgescu P., Păunescu Eug., *Metode biochimice de diagnostic și cercetare*, București, Edit. medicală, 1960.
3. Donaggio A., *Testul de „obstacol" urinar*, Bull. Soc. Biol. Sper., **8**, 1 436 (1933).
4. Bugard R. *Test semicantitatif de Donaggio*, Ann. Biol. clin., **16**, *7—9*, 539 (1958).
5. Sussman M. B., Haug M. R., Lamport M. J., *Rehabilitation problems among special types of tuberculous patients*, Amer. Rev. Resp. Dis., **92**, *2*, 261 (1965).
6. Kissen D. M., *Some psychosocial aspects of pulmonary tuberculosis*, Int. J. Soc. Psychiat., **3**, *4* (1958).
7. Haralambie G., *L'élimination de la tyrosine pendant l'effort physique*, Méd., éduc. phys. et sport, **IV**, 325 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 1, 47–52 (1967)

CONTRIBUŢII LA METODICA DETERMINĂRII GLICOPROTEINELOR

M. SIBI, F. ŞERBAN, A. BUSUIOC, D. CERNĂTESCU şi I. COLEA

616.1

Rezumat. — Pentru determinarea glicoproteinelor în ser s-a utilizat paralel coloraţia electroforeogramelor cu albastru de toluidină, cu fucsină acidă şi cu fucsină bazică, care dau rezultate foarte diferite. În scopul de a alege metoda de lucru care să dea rezultatele cele mai bune, s-a făcut, paralel cu determinarea glicoproteinelor prin coloraţia electroforeogramelor, determinarea glicoproteinelor fiecărei fracţiuni electroforetice în parte, după eluţia şi hidroliza ei. S-a pus în evidenţă, prin metoda eluţiei, prezenţa glicoproteinelor şi în fracţiunea albuminelor serice, cum o indică metoda cu toluidină şi fucsină acidă, spre deosebire de metoda cu fucsină bazică, care nu le pune în evidenţă.

Studiul glicoproteinelor a preocupat pe mulţi cercetători şi azi este unanim admis că ele sînt de multe ori foarte crescute în tuberculoză, pneumonie, gută, boala canceroasă, în anumite cazuri de insuficienţă renală etc. [1], [2].

S-au descris de asemenea cazuri de denutriţie în care, pentru a menţine fixitatea mediului intern la o presiune oncotică normală, glicoproteinele şi lipoproteinele sînt crescute, putînd reveni la concentraţii normale după cîteva săptămîni de regim normal.

În hepatită, formele cele mai grave fiind acelea care, pe lîngă perturbări funcţionale hepatice, prezintă şi perturbări ale funcţiei pancreatice, care duc la accentuarea deficienţelor de fosforilare şi deci de metabolizare a glucidelor, lipidelor şi protidelor, ne-am propus de a întreprinde, alături de cercetările proteinogramelor şi lipidogramelor, un studiu al glucidogramelor.

Făcînd paralel proteinograma, lipidograma şi glucidograma, putem avea o imagine completă a stării umoral-coloidale a organismului. O serie de cercetări arată că într-un proces inflamator, atunci cînd glicoproteinele persistă a fi crescute chiar dacă starea clinică indică o ameliorare, se pot prevedea recăderi.

Punerea în evidenţă la timp a acestei perturbări poate uşor să ajute la instituirea unui regim raţional care nu permite acumularea de zahăr proteidic.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a utilizat colorarea glucidogramelor cu albastru de toluidină, fucsină bazică şi fucsină acidă decolorată [3], [4], [5]. Paralel, s-au determinat glicoproteinele în eluatele electroforetice ale fiecărei fracţiuni de pe electroforeogramă. Electroforeza a fost făcută în tampon veronal-

veronal sodic la pH 8,6, la 300 volţi şi 5 mA. S-au folosit două benzi de hîrtie Whatman nr. 1, cu o lungîme de 20 cm şi lăţime de 3 cm. Pe fiecare bandă se pun cîte 0,4 ml ser. Una din benzi este colorată cu albastru de brom-fenol. Banda rămasă albă, încă umedă, se pune în paralel cu proteinograma colorată şi se taie fiecare fracţiune separat. Fiecare fracţiune astfel obţinută — serum-albumină, globuline *alfa*$_1$, *alfa*$_2$, *beta* şi *gama* — se eluează apoi după tehnica Macheboeuf (citat după [6]). Volumul final pentru fiecare fracţiune eluată a fost de 2 ml. S-au adăugat de la începutul eluţiei 0,2 ml acid sulfuric 1/4 (v/v), după care s-a făcut hidroliza eluatelor la baie marină timp de 1/2 oră. Se neutralizează apoi foarte exact cu NaOH în prezenţa brom-timolului.

Precipitarea proteinelor a fost făcută cu 5 ml $ZnSO_4$ + 1ml NaOH şi se continuă după metoda Hagedorn. Paralel s-au făcut dozarea glicoproteinelor din ser şi glicemia.

Observaţii. Atragem atenţia asupra unor detalii ce trebuie luate în seamă. În ceea ce priveşte coloraţia cu albastru de toluidină, în cazurile în care există glucide la nivelul albuminelor serice, este bine să se facă un martor colorat cu albastru de toluidină, fără tratament prealabil cu acid periodic şi brom, pentru a preveni cazurile în care ar putea să existe un surplus de grupări carboxilice libere, corespunzînd acizilor glutamic şi aspartic.

În ceea ce priveşte leucoderivatul fucsinei acide, acesta trebuie să fie complet decolorat în tot timpul manipulaţiilor, ca şi fucsina bazică, căci, după cum fucsina bazică colorată se fixează pe lipide, fucsina acidă recolorată se fixează pe proteine.

Dacă se ţine seama de aceste observaţii, este util de a se amesteca fucsina acidă cu cea bazică atunci cînd se face reactivul Schiff.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aplicînd paralel aceste metode de colorare a glucidogramelor, am putut constata o lipsă de corespondenţă, ceea ce ne-a determinat să căutăm cauzele acestor divergenţe.

A. Compararea metodelor de colorare a glucidogramelor cu rezultatele obţinute prin metoda eluţiei fracţiunilor electroforeogramelor

Coloraţia cu reactivul acid periodic-fucsină bazică Schiff, care a fost şi este încă aşa de utilizat, dă coloraţie cu globulinele, dar cu glicoproteinele de la nivelul albuminelor serice coloraţia nu dă rezultate exacte.

Cînd glicoproteinele care există în albuminele serice sînt crescute, se obţine aproape instantaneu, la punerea electroforeogramei în reactiv Schiff, o coloraţie net vizibilă, dar care dispare cu spălările ce se fac cu soluţii de bisulfit, dînd aparenţa unei lipse de glucide în zona albuminelor serice.

Am interpretat aceasta considerînd că reducerea are loc în adevăr în zona albuminelor serice, dar că fucsina bazică recolorată, neavînd afinitate pentru proteinele acide, nu se poate fixa cum se fixează pe proteinele neutre.

Leucofucsina acidă redusă de glucide se poate fixa pe proteinele acide, ca şi albastrul de toluidină, cînd la acest nivel există un surplus de zahăr proteic.

În cazurile în care cantitatea de glucide este scăzută la nivelul albuminelor serice, colorația fracțiunii corespunzătoare electroforeogramei nu apare nici cu leucofucsina acidă, nici cu albastrul de toluidină.

Ne-am propus să ne explicăm divergențele care există între metodele citate.

Am separat mai întîi albumina de globulină, dozînd separat în fiecare fracțiune glicoproteinele după metoda Bierry. În cazurile studiate, am găsit că există o cantitate de glucide în albuminele serice, ca și în globuline, suma lor dînd exact cantitatea de glucide din glicoproteinele totale.

Pentru a putea determina glucidele tuturor fracțiunilor electroforeogramei, am adoptat tehnica de eluție a lui Macheboeuf (citat după [6]) și am obținut rezultatele notate în tabela 1.

Tabela 1

Cantitatea de glucide conținută în fracțiunile electroforetice ale serului sanguin

Cazul	Albumine serice (g‰)	*alfa*$_1$ (g‰)	*alfa*$_2$ (g‰)	*beta* (g‰)	*gama* (g‰)
1. P.I. (I)	1,00	0,60	0,82	0,75	1,98
P.I. (II)	0,52	—	0,75	0,52	1,25
2. A.S. (I)	0,52	0,37	0,62	0,54	0,62
A.S. (II)	0,45	0,32	0,62	0,95	0,62
3. M.I. (I)	0,50	0,62	0,40	0,40	0,70
M.I. (II)	0,50	—	0,18	0,22	0,85
4. B.S. (I)	1,00	0,55	0,17	0,48	0,95
B.S. (II)	0,28	0,20	0,70	0,41	0,63
5. F.G. (I)	0,35	0,17	0,35	0,12	0,90
F.G. (II)	0,25	0,44	0,32	0,44	0,90
6. M.S. (I)	0,57	0,55	0,50	0,60	0,67
M.S. (II)	0,38	0,25	0,53	0,25	0,97
7. V.A.	0,35	0,35	0,60	0,58	0,85
8. R.I.	0,33	0,15	0,40	0,33	0,82
9. C.A.	0,97	0,52	1,17	0,22	1,42
10. G.S.	0,67	0,45	0,30	0,40	0,60
11. B.I.	0,50	0,40	3,12	0,42	1,52
12. M.A.	1,40	0,53	0,95	0,97	0,85
13. F.S.	0,80	0,88	0,93	0,97	1,95
14. R.I.	0,33	0,15	0,40	0,38	0,82
15. G.A.	0,72	0,62	0,62	0,52	1,20
16. U.I.	0,95	0,85	1,13	0,40	1,75
17. D.S.	0,17	0,17	0,62	0,90	1,25
18. B.T.	0,28	0,36	0,59	0,41	0,78

Dacă rezultatele obținute prin eluție se compară cu rezultatele obținute prin colorarea electroforeogramelor, se poate observa că :

În cazurile în care prin metoda eluției glucidele albuminelor serice apar relativ scăzute, se remarcă și o scădere a forței de reducere prin colorarea glucidogramelor cu albastrul de toluidină sau cu leucofucsina acidă (fig. 1). În figura 1 se mai poate remarca de asemenea că fracțiunea *alfa*$_2$ conține mai multe glucide decît fracțiunea *beta*, atît prin metoda eluției, cît și prin metodele de colorare a glucidogramelor.

În figura 2, concentrarea glicoproteinelor este mai mare și puterea reducătoare a albuminelor serice și a globulinelor este ridicată atît prin metoda eluției, cît și prin colorația glucidogramelor.

În figura 3 se poate observa creșterea glicoproteinelor atît prin metoda eluției, cît și prin colorația glucidogramelor. Este util de a se remarca de asemenea, în acest caz, că fracțiunea $alfa_2$, crescută pe glucidograma colorată cu albastrul de toluidină, este relativ scăzută pe proteinogramă, ceea ce pune în evidență o proporție mai mare de glucide față de proteine în fracțiunea $alfa_2$.

Se știe că scăderea globulinelor normale și creșterea globulinelor care au o cantitate mărită de glucide pot avea un prognostic sever. Cînd glicoproteinele apar crescute, avem un indiciu de tulburare survenită în metabolismul glucidic și protidic, la care se adaugă o deficiență funcțională renală. Chabanier [7] citează la anumiți nefritici hiperglicemii de 3 g/l, fără glicozurie, iar Bierry găsește glicoproteinele crescute la nefritici. Se înțelege că în aceste cazuri trebuie să survină cu timpul o tendință de apărare a organismului contra acestei substanțe reducătoare, care schimbă potențialul de oxido-reducere celular. Aceasta ar duce la formarea zahărului proteic.

Această creștere a glicoproteinelor serice, fiind în legătură cu creșterea glicoproteinelor din țesutul conjunctiv, formează un teren favorabil pentru microbi și virusuri.

Pe de altă parte, glicoproteinele pot atinge ponderi moleculare foarte mari și pot favoriza hemoragii la nivelul capilarelor [8], deci extravazări de sînge în țesuturi, unde se formează cheaguri, care pot favoriza adevărate culturi de țesuturi dacă fibrinolizina nu este într-o concentrație suficientă pentru a liza fibrina.

B. Influența lipidelor asupra coloratiei glucidogramelor

Se poate remarca în figura 2 că glicoproteinele *beta* sînt scăzute în cazul metodei eluției, dar par crescute pe glucidogramele colorate cu toluidină. S-a putut dovedi că aceasta se datorește faptului că lipidele sînt crescute, cum se poate constata după lipidograma ce trebuie făcută în paralel cu proteinograma și glucidograma pentru a putea interpreta bine rezultatele.

În adevăr, punînd pe hîrtia de filtrare o cantitate mică de ulei vegetal, am putut obține colorarea cu albastru de toluidină, după oxidarea cu acid periodic și brom, care oxidează în același timp cu glucidele, și grupările alcoolice secundare ale gliceridei lipidelor, care fixează toluidina.

C. Studiul glicoproteinelor legate de fibrinogen

Dat fiind că fibrinogenul poate varia între 2 și 9 $g^0/_{00}$ și conține cantități mari de glucide, care variază foarte mult în diferite afecțiuni, ne-am propus de a determina glicoproteinele atît în plasmă, cît și în ser, în paralel, exact în aceleași condiții.

În general, fibrinogenul trebuie să apară pe proteinogramă între fracțiunile *beta* și *gama*, iar în anumite cazuri apare mai net pe glucidograma colorată cu albastru de toluidină, cînd în fibrinogen există o proporție mai mare de glucide. Pentru a putea deduce cantitatea de glucide din fibrinogen, paralel cu determinarea proteinogramei, lipidogramei și glucidogramei în ser și plasmă, am făcut o determinare a glucidelor din diferite eluate ale electroforeogramei.

Am făcut în același timp dozarea glicoproteinelor totale în plasmă și ser.

În cele 25 de cazuri pe care le-am studiat, s-a putut constata că, în majoritatea cazurilor, puterea reductoare a plasmei corespunde exact puterii reductoare a serului.

Aceasta poate corespunde faptului că în timpul coagulării fibrinogenul se separă în două fracțiuni [9], [10], un monomer de fibrină, avînd o pondere moleculară de 300 000, care se polimerizează, și o fracțiune fibrinopeptidică, avînd o pondere moleculară de 4 000—8 000, cu sarcină foarte negativă și care desigur conține partea glucidică a fibrinogenului și migrează la polul negativ, în direcția serinelor.

CONCLUZII

Utilizînd metoda de dozare a fracțiunilor electroforetice după hidroliza lor, s-a folosit colorația glucidogramelor, care se poate face destul de ușor și poate da indicații bune.

Pentru o bună interpretare a rezultatelor, paralel cu glucidogramele și lipidogramele, trebuie făcute și proteinogramele, care dau o imagine a stării coloidale umorale pentru a fi adusă cît mai repede la normal.

Prin acest paralelism se pot pune în evidență cazurile cu o creștere a cantității de glucide față de proteine și lipide sau, în alte cazuri, scăderea lor față de concentrația normală.

Se observă un paralelism între glucidogramele colorate cu toluidină și acelea colorate cu leucofucsină acidă, dar, pe cînd glucidogramele colorate cu leucofucsină nu sînt influențate de lipide, cele colorate cu toluidină sînt influențate de hiperlipemii, ceea ce necesită confruntarea lipidogramelor cu glucidogramele, pentru interpretarea rezultatelor.

Cînd glicoproteinele determinate prin metoda eluției sînt scăzute în fracțiunea albuminelor serice, glucidogramele colorate cu toluidină și cu leucofucsină acidă prezintă o fracțiune foarte puțin colorată în zona albuminelor serice.

S-a demonstrat că există un paralelism între glicoproteinele determinate prin metoda eluției în fracțiunea albuminelor serice și colorația acestei fracțiuni cu albastru de toluidină sau cu fucsină acidă.

În ceea ce privește comparația eluatelor cu glucidogramele colorate cu fucsină bazică, nu apare un paralelism cu determinarea chimică, dat fiind că fucsina bazică nu se poate fixa pe proteinele acide și dispare după spălare.

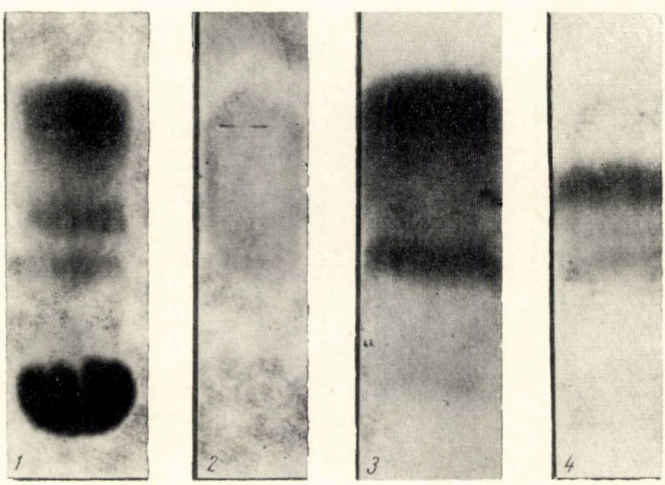
Glucidele din plasmă sînt identice cu glucidele serului, deși fibrinogenul conține o mare cantitate de glucide.

Prezentat la redacție la 27 decembrie 1965

Secția de nutriție a Academiei, Filiala Iași și Institutul de medicină și farmacie, Iași

BIBLIOGRAFIE

1. G. E. W. Wolstenholme, M. O'Connor, *Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, Ciba Foundation Symposium*, Londra, E. A. Churchill, 1950.
2. J. Bierry, M. Rathery, *Importance du sucre protéidique*, Paris, Masson, 1934.
3. W. Cassasus, *Sérogramme dans les maladies digestives*, Thèse, Paris, 1934.
4. E. D. Bayrd, B. Hagedorn, Mc. Cuchin, *Macroglobulinemia*, J. Amer. med. Ass., **3**, 724 (1965).
5. S. Comoroşan, N. Mitrică, *Biochimie medicală*, în *Metodele laboratorului clinic*, Bucureşti, Edit. medicală, 1964.
6. P. Georgescu, Eug. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Bucureşti, Edit. medicală, 1960.
7. J. Chabanier, *Diabète chez les néphrétiques*, Paris, Masson, 1934.
8. I. Aron, J. Vargues, I. Croussin, *Diabète*, Arch. Nut. Appar. digest., 1 250, 1 (1965).
9. D. Hals, *Hémostase*, Paris, Baillière, 1963.
10. H. Neurath, K. Bailey, *The Proteins*, New York, Acad. Press, 1954.



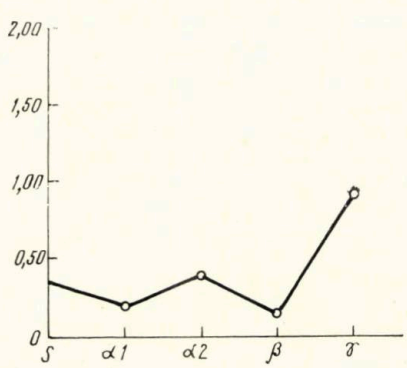
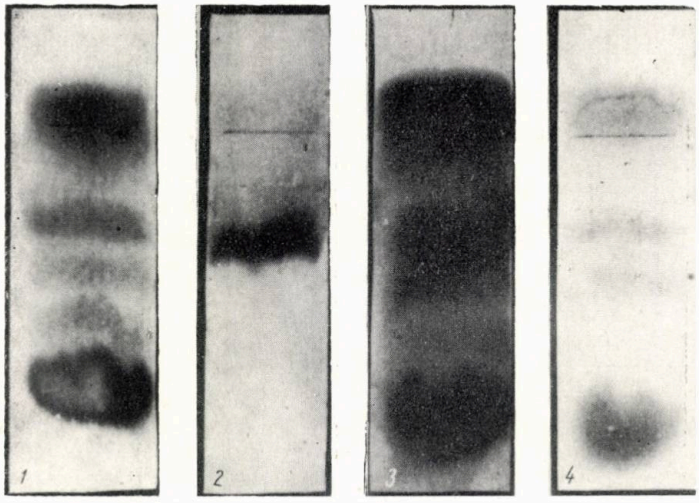


Fig. 1. — *Electroforeza proteinelor din serul sanguin uman.*

1. Proteinogramă. *2.* Lipidogramă. *3.* Glucidogramă colorată cu toluidină. *4.* Glucidogramă colorată cu leucofucsină acidă. *5.* Reprezentarea grafică a puterii reductoare a fracţiunilor eluate şi hidrolizate.



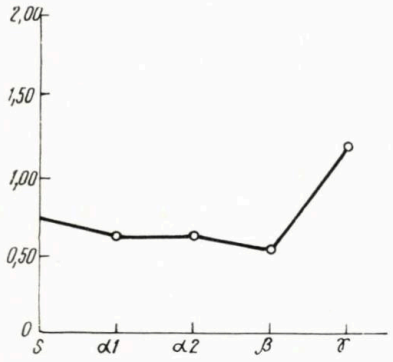
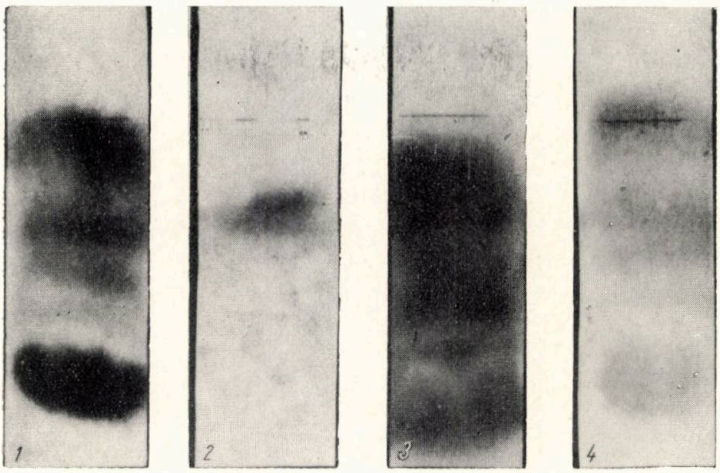


Fig. 2. — *Electroforeza proteinelor din serul sanguin uman.*

1. Proteinogramă. *2.* Lipidogramă. *3.* Glucidogramă colorată cu toluidină *4.* Glucidogramă colorată cu leucofucsină acidă. *5.* Reprezentarea grafică a puterii reductoare a fracţiunilor eluate şi hidrolizate



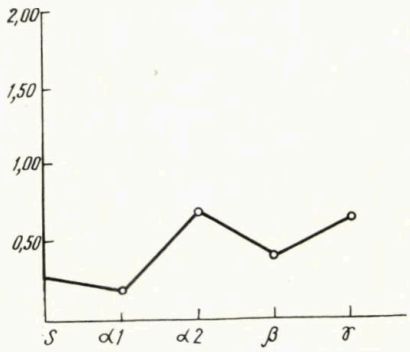


Fig. 3. — *Electroforeza proteinelor din serul sanguin uman.*

1. Proteinogramă. *2.* Lipidogramă. *3.* Glucidogramă colorată cu toluidină. *4.* Glucidogramă colorată cu leucofucsină acidă. *5.* Reprezentarea grafică a puterii reductoare a fracțiunilor eluate și hidrolizate. Se observă corespondența între $alfa_2$-globulinele puse în evidență prin metoda eluției și prin metoda colorației cu toluidină.

ST. CERC. BIOCHIM., **10**, *1*, 53–68 (1967)

REFERATE GENERALE

MECANISMUL FOSFORILĂRII OXIDATIVE

ELENA CRISTEA

612.2

Nevoile energetice ale organismelor animale sînt acoperite în cea mai mare măsură de energia mobilizată în procesul de respiraţie terminală — combinarea hidrogenului substratelor cu oxigenul molecular. Atomii de hidrogen ai substratelor, mobilizaţi sub acţiunea unor dehidrogenaze, parcurg treptat un sistem de cupluri redox cu potenţiale oxido-reducătoare din ce în ce mai ridicate, combinîndu-se în cele din urmă cu oxigenul molecular :

$$2\ H + \frac{1}{2} O_2 = H_2O$$

În această reacţie este mobilizată o cantitate de energie de 52 kcal pentru 2 atomi-gram de hidrogen care se combină cu oxigenul. Energia este liberată în porţiuni mai mici şi este conservată în legăturile macroergice ale adenozin-trifosfatului. Procesul de conservare a energiei mobilizate în lanţul respirator şi de sinteză a adenozin-trifosfatului este cunoscut sub numele de fosforilare oxidativă. Iniţial s-a crezut că transportul de energie de la nivelul lanţului respirator la procesele endergonice se face exclusiv prin intermediul adenozin-trifosfatului. În ultimii ani s-au acumulat numeroase date care demonstrează că energia mobilizată în lanţul respirator poate fi utilizată şi sub formă de intermediari primari macroergici. Cu toate că aceşti intermediari nu au fost încă identificaţi şi mai poartă denumiri ca ~I, X ~ I sau X ~ P, totuşi existenţa lor este neîndoielnică.

În cele ce urmează vom prezenta pe scurt lanţul respirator, acordînd un spaţiu mai larg mecanismului cuplării fosforilării cu respiraţia. Datorită spaţiului limitat pe care-l avem la dispoziţie, nu vor fi prezentate multe probleme înrudite organic cu fosforilarea oxidativă.

I. LANŢUL RESPIRATOR

Lanţul respirator reprezintă un complex de enzime care transferă atomi de hidrogen (sau electroni) în etape succesive de la substrat la oxigenul molecular [1]. Această concepţie privind oxidarea metaboliţilor s-a născut după descoperirea de către Keilin în 1925 [2] a citocromilor şi precizarea rolului lor în procesul de respiraţie celulară. Pînă la această dată predomina concepţia că oxidarea metaboliţilor are loc într-o singură etapă, prin intermediul unor enzime individuale care mediază combinarea hidrogenului substratului cu oxigenul molecular. În privinţa rolului catalitic al enzimei s-a iscat o controversă între şcoala lui Warburg, pe de

o parte, care susținea că actul catalitic constă în activarea oxigenului, și școala lui Wieland-Thunberg, pe de altă parte, după care hidrogenul substratului este activat de enzimă și adus într-o formă în care se poate combina cu oxigenul molecular.

Inițial, Keilin a considerat citocromii ca simpli transportori de hidrogen, a căror interacțiune cu substratele celulare și cu oxigenul necesită intervenția unor enzime activatoare: dehidrogenaza lui Thunberg înspre substrat și indofenoloxidaza (identică cu fermentul respirator al lui Warburg) înspre oxigen. În această formulare, cele două teorii privind activarea hidrogenului și activarea oxigenului, care se opuneau una alteia, sînt asimilate într-o concepție unitară. Respirația celulară nu se realizează printr-un act unic de transfer al hidrogenului de la substrat la oxigenul molecular, ci prin cel puțin trei etape: dehidrogenază, citocromi, oxidază.

În anii care au urmat descoperirii citocromilor, au fost identificate alte substanțe care mediază transferul de electroni de la substrat la oxigen. Prezentăm pe scurt componenții care sînt recunoscuți ca membri ai lanțului respirator de către cei mai mulți autori.

A. Componenții lanțului respirator

Citocromul b, identificat spectroscopic încă din 1925 de către Keilin, este înglobat ferm în structura particulelor respiratorii [2]. Hemul său este protoporfirina IX. Ferocitocromul *b* are trei maxime de absorbție: la 429 mμ (banda γ sau banda Soret), la 562 mμ (banda α) și la 532 mμ (banda β).

A fost obținut sub forma unui component cu o greutate moleculară minimă de 30 000 [3]. Potențialul E'_0 al citocromului *b* este de 0,077 volți [3].

Citocromul c are ca grupare prostetică protoporfirina IX, legată covalent de apoproteină. Proteina cuprinde 104 resturi de aminoacizi, iar resturile de cisteină din pozițiile 14 și 17 formează punți tioeterice cu grupările vinil din pozițiile 2 și 4 ale nucleului porfirinic [4]. Greutatea moleculară minimă a citocromului *c* este de 13 016 și are un conținut procentual în fier de 0,429 [4]. Ferocitocromul *c* absoarbe puternic la 550 mμ. Potențialul său E'_0 este de 0,254—0,262 volți [4].

Citocromul c_1, a fost descoperit mai tîrziu decît ceilalți componenți ai sistemului citocromic, deoarece spectrul său de absorbție în vizibil se suprapune aproape cu cel al citocromului *c* [5]. Citocromul c_1 are o grupare prostetică identică cu a citocromului *c*, inclusiv legătura puternică, prin două punți tioeterice, dintre hem și proteină. Citocromul c_1 este legat de formațiile particulate mitocondriale mai puternic decît citocromul *c*. Greutatea moleculară a citocromului c_1 este mai mare decît a citocromului *c* [3]. Potențialul E'_0 al citocromului c_1 este de 0,223 volți.

Citocromii a și a_3. Citocromul *a* a fost recunoscut ca un membru al sistemului citocromic de la primele cercetări spectroscopice [2], [6]. Mai tîrziu, Keilin și Hartree [7], cercetînd răspunsul spectroscopic al particulelor din inimă după adăugare de oxid de carbon sau cianură, constată apariția în ultraviolet a unei benzi noi în regiunea corespunzătoare citocromului *a*. Ei atribuie această bandă γ unui component distinct de citocromul *a*, pe care îl numesc citocromul a_3. Fiind autooxidabil, Keilin și Hartree [7] îl identifică cu indofenoloxidaza, presupusa enzimă care ar media oxidarea citocromilor prin oxigenul molecular, și-i dau și denumirea de citocromoxidază. Citocromul a_3 are afinitate pentru cianură, azidă, oxid de carbon, cunoscuți inhibitori ai respirației terminale.

Citocromii *a* și a_3 nu se deosebesc prin grupările lor prostetice [8]. Cuprind hemuri în care substituenții nucleului porfirinic din pozițiile 2, 4 și 8 sînt modificați față de substituenții celorlalți citocromi. În poziția 8 au o grupare formil, în poziția 2 un rest de alcool alifatic, iar în poziția 4 un rest etilenic. Citocromii de tip A în formă redusă absorb maximal la 603 — —605 mμ și la 443—445 mμ.

Citocromii *a* şi a_3 sînt strîns înglobaţi în matricea lipoproteică a particulelor respiratorii. Prin tratarea particulelor respiratorii cu săruri biliare sau cu detergenţi sintetici s-a obţinut un amestec de citocrom $a + a_3$ în formă solubilă, aproape omogenă [8]. Niciodată însă cei doi componenţi nu au putut fi obţinuţi ca entităţi separate. Datorită inseparabilităţii citocromilor *a* şi a_3, a fost pusă la îndoială existenţa a două specii moleculare distincte. Chance şi Williams [9] şi Slater [1], admiţînd diferenţierea funcţională, nu fizică, a componenţilor lanţului respirator, tratează citocromii *a* şi a_3 ca entităţi separate. Citocromii *a* şi a_3 sînt specii moleculare distincte, cu toată identitatea grupărilor lor prostetice. Citocromul *a* este un transportor de electroni întocmai ca citocromii *c*, c_1, *b*. Citocromul a_3, autooxidabil, funcţionează ca oxidază terminală, catalizînd oxidarea imediată a citocromului *a*.

Punctul de vedere al altor cercetători ţine seama de relaţia structurală dintre citocromul *a* şi activitatea citocrom-oxidazică, de inseparabilitatea lor fizică, dar nu confundă componenţii *a* şi a_3 [10]. Conform recomandării Comisiei pentru nomenclatura enzimelor, complexul citocrom $a + a_3$ este denumit citocrom *c*: O_2-oxido-reductază (E.C. 1.9.3.1.).

Okunuki şi şcoala sa [11] nu recunosc citocromul a_3 ca o entitate distinctă cu funcţie oxidazică. Ei păstrează pentru singurul compus existent în preparatele oxidazice numele de citocrom *a*. Acest component are afinitate pentru oxigen, se oxigenează întocmai ca hemoglobina, dar nu este autooxidabil. Activitatea citocrom-oxidazică — oxidarea citocromului *a* redus de către oxigenul molecular-— apare numai dacă citocromul *a* este tratat cu citocrom *c*. După Okunuki [11], funcţia de oxidază terminală a lanţului respirator ar avea-o un complex format din citocrom „a", oxigen şi citocrom *c*.

Green [12] nu recunoaşte existenţa unui citocrom a_3 cu funcţie oxidazică. Demonstrînd rolul cuprului în activitatea citocrom-oxidazică, Green şi colab. [12], [13] admit că funcţia oxidazică este o proprietate a complexului citocrom *a* — Cu. Există numai o specie de citocrom *a* care, asociat cu cuprul, devine autooxidabil, cuprul jucînd rolul unei verigi catalitice între hem şi oxigenul molecular. Inhibiţia respiraţiei terminale prin cianură, sulfură, tioglicolat, hidroxilamină s-ar datora afinităţii cuprului pentru aceşti agenţi.

NADH -dehidrogenaza* în lanţul respirator intact mediază transferul de echivalenţi reducători de la NADH la sistemul citocromilor. NADH-de hidrogenaza este ancorată puternic în structura particulelor respiratorii şi izolarea ei a fost dificilă. Singer şi colab. [15—20] au obţinut această enzimă în formă solubilă, omogenă şi au precizat proprietăţile ei moleculare şi cinetice. NADH-dehidrogenaza cuprinde ca grupare prostetică nucleul flavinic, ataşat puternic de proteină. Enzima cuprinde, pe lîngă flavină, un exces mare de fier neheminic. Pentru 1— $-1{,}1 \cdot 10^6$ g de proteină există 1 mol de flavină şi 16 atomi de fier neheminic [18]. Enzima pură are afinitate maximă pentru NADH, iar cel mai bun acceptor de electroni este fericianura de potasiu [14], [17]. În stare de puritate înaintată, enzima nu transferă electronii luaţi de la NADH la coenzima Q sau la citocromul *c*, este lipsită de activitate NADH-coenzimă Q reductazică sau NADH-citocrom *c* reductazică. Problema acceptorului imediat de electroni al NADH-dehidrogenazei în lanţul respirator intact nu este încă clară. Există multe indicaţii că acesta ar fi fierul neheminic [12].

Succinat-dehidrogenaza a fost obţinută în stare de puritate înaintată, cînd apare electroforetic omogenă şi monodispersă la ultracentrifugare [21], [22], [23]. Succinat-dehidrogenaza cuprinde patru atomi de fier neheminic per mol de flavină, fierul fiind legat puternic în enzima intactă [21]. Flavina nu este liberată prin deproteinizare, ceea ce sugerează o legătură covalentă

---

* Prescurtări: NAD^+ — nicotinamid-adenin-dinucleotid oxidat; NADH — nicotinamid-adenin-dinucleotid redus; P_i — fosfat anorganic; ADP — adenozin-difosfat; ATP — — adenozin-trifosfat; Fp— flavoproteină; Fp_D — NAHD-dehidrogenaza; Fp_S — succinat-dehidrogenaza; a, a_3, b, c, c_1 — citocromii *a*, a_3, *b*, *c* ,respectiv c_1; Co Q — coenzimă *Q*; DNP — *2,4,* -dinitrofenol.

între nucleul izoaloxazinic şi proteină [22]. Substratul specific al enzimei este succinatul. Specificitatea enzimei pure faţă de acceptorul de electroni este destul de largă. Acceptorul pentru care enzima pură are afinitate maximă este fenazin-metosulfatul. Enzima în diferite stadii de puritate are oarecare afinităţi şi pentru alţi acceptori : albastru de metilen, fericianură, indofenol, citocrom *c*, săruri de tetrazolium.

Succinat-dehidrogenaza este inhibată competitiv de diverşi anioni polivalenţi : malonat, oxaloacetat, fumarat, pirofosfat, homologi superiori ai succinatului.

Coenzima Q, sau *ubichinona*, este un component al lanţului transportor de electroni şi participă la procesul fosforilării oxidative. Ubichinonele sînt derivaţi ai *2,3*-dimetoxi-5-metil-benzochinonei, cu o catenă izoprenoidă în poziţia 6. Numărul de resturi izoprenoide variază de la 6 la 10, după natura ţesutului animal, specie sau regn. La cele mai multe mamifere, inclusiv omul, catena laterală din poziţia 6 cupriunde 10 resturi izoprenoide (coenzima Q_{10} sau coenzima Q_{50}, 50 după numărul de atomi de carbon din catena laterală). O excepţie : la şobolan predomină coenzima Q_9 [25].

Ubichinona participă la transportul electronilor prin lanţul respirator ; ea suferă succesiv oxidări şi reduceri în timpul oxidării succinatului sau a NADH-ului în mitocondrii [26], [27]. Poziţia coenzimei Q în lanţul respirator s-a stabilit cu ajutorul inhibitorilor. Reducerea coenzimei Q este inhibată de inhibitorii succinat-dehidrogenazei (malonat, oxaloacetat) sau ai NADH-dehidrogenazei. Antimicina A inhibă reoxidarea ubichinonei reduse. Prin aceste experienţe, locul de acţiune al coenzimei Q este plasat între flavo-proteinele lanţului respirator — succinat-dehidrogenaza şi NADH-dehidrogenaza — şi punctul sensibil la antimicina A [12]. Participarea coenzimei Q în procesul fosforilării oxidative a fost demonstrată de către Hatefi [28] în experienţe în care s-au urmărit modificările stării de oxido-reducţie a coenzimei Q la tranziţia de la o stare de fosforilare activă la o stare de repaus. Fosfatul anorganic modifică starea de oxido-reducţie a coenzimei Q spre o creştere a gradului de reducere ; prin adăugare de de ADP are loc o reoxidare a ubichinolului.

B. Secvenţa componenţilor lanţului respirator

Rolul de transportor de electroni în lanţul respirator din celulele mamiferelor este unanim recunoscut pentru NADH-dehidrogenază, succinat-dehidrogenază, citocromii *a*, a_3, *b*, *c*, c_1, coenzima Q şi fierul neheminic. Secvenţa în care acţionează aceşti compuşi s-ar putea principial stabili prin izolarea componenţilor individuali şi reconstituirea lanţului respirator pas cu pas, ceea ce nu este însă posibil, întrucît transportorii de electroni sînt înglobaţi în elementele particulate ale celulei. Numai doi din componenţii sistemului transportor de electroni sînt obţinuţi uşor în formă solubilă : citocromul *c* şi coenzima Q [12]. Pe de altă parte, alţi transportori, ca NADH-dehidrogenaza şi succinat-dehidrogenaza, o dată ce au fost scoşi din ambianţa lor naturală, nu mai interacţionează cu acceptorii de electroni fiziologici [14], [16]. Este necesară o anumită dispoziţie spaţială a membrilor lanţului respirator pentru a avea loc un flux rapid de electroni.

Rezultate importante în ceea ce priveşte ordinea de interacţiune a transportorilor au fost obţinute prin urmărirea vitezelor cu care ei se oxidează şi se reduc în timpul funcţionării lanţului respirator. Metoda spectroscopică de observaţie a nivelurilor de oxidare a transportorilor a fost şi rămîne încă una din metodele cele mai adecvate pentru studiul interacţiunii componenţilor lanţului respirator. Un alt mijloc eficace de urmărire a cineticei transferului de electroni prin lanţul respirator este utilizarea de inhibitori cu acţiuni specifice asupra unor porţiuni bine determinate ale lanţului. Măsurarea simultană a inhibiţiei respiraţiei şi a gradului de oxidare sau reducere al transportorilor a permis cunoaşterea mai aprofundată, pe de o parte, a modului de acţiune a inhibitorilor, iar pe de altă parte a felului în care sînt ordonaţi compo-

nenții în lanț, informațiile dobîndite într-o direcție permițînd adîncirea cunoștințelor în cealaltă. O localizare absolută a unui component în raport cu ceilalți ar fi posibilă dacă am cunoaște exact concentrațiile fiziologice ale transportorilor și ale substratelor, precum și potențialele de oxido-reducere a diverselor cupluri redox. Potențialele normale (E_0') permit numai o ordonare aproximativă a transportorilor de electroni.

Poziția citocromului a_3 ca ultim termen al lanțului respirator rezultă din abilitatea lui de a fi autooxidabil, din afinitatea lui pentru oxidul de carbon și din reversibilitatea la lumină a complexului citocrom $a_3 \cdot CO$. Prin aerarea unui sistem mitocondrial fosforilant, anaerob (cu citocromii în stare redusă), ordinea în care componenții sistemului citocromic devin mai oxidați este: citrocrom $a_3 > a > c > b$ [9]. Citocromul c_1 nu poate fi observat în aceste condiții, banda lui în vizibil aproape suprapunîndu-se cu cea a citocromului c. Flavo-proteinele se oxidează mai tîrziu decît citocromul b. Chance și Williams [9] plasează citocromii în sistemele fosforilante în ordinea :

$$\text{flavo-proteine} \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow a \rightarrow a_3 \rightarrow O_2$$

Poziția citocromului c_1 a fost stabilită prin experiențe conduse la temperatura aerului lichid cînd benzile citocromilor c și c_1 pot fi observate separat [29]. Citocromul c_1 mediază transferul de electroni dintre citocromul b și c. În regiunea citocromului b din lanțul respirator mai acționează în mod sigur cel puțin alți doi componenți, fierul neheminic și coenzima Q. S-au adus dovezi suficiente că fierul neheminic acționează spre partea dinspre oxigen a flavo-proteinelor [12]. După Green [12], coenzima Q ar media transferul de electroni dintre fierul neheminic și citocromul b. Faptele de mai sus pot fi rezumate în următoarea schemă a lanțului respirator [12] :

$$\begin{matrix} NADH \rightarrow Fp_D \rightarrow Fe \rightarrow CoQ \searrow \\ Succinat \rightarrow Fp_S \rightarrow Fe \rightarrow CoQ \nearrow \end{matrix} \quad b \rightarrow c_1 \rightarrow c \rightarrow a \rightarrow a_3 \rightarrow O_2$$

C. Organizarea lanțului respirator

Sistemul transportor de electroni și enzimele necesare conservării energiei mobilizate în cursul funcționării lanțului respirator sînt localizate în elementele structurale ale mitocondriilor și constituie însuși sistemul de membrane din interiorul mitocondriei. Mitocondriile mai îndeplinesc o serie de funcții auxiliare fosforilării oxidative propriu-zise, dar sistemele catalitice responsabile de aceste funcții sînt localizate în spațiul fluid al mitocondriilor, nu fac parte din structura membranelor mitocondriale.

Mitocondriile oricărei specii de celule sînt alcătuite după același principiu : un sistem de membrane între care există un spațiu fără structură [30]. Mitocondria este delimitată în afară de o membrană externă. Sub membrana externă și separată de aceasta printr-un spațiu fluid nestructurat se află membrana internă. Membrana internă invaginează spre interior sub formă de lamele, pe care Palade [30] le-a numit *cristae mitochondriales*. Cristele sînt continuări ale membranei interne și rolul lor este de a mări suprafața acestei membrane. Cele două membrane au permeabilități diferite, astfel că pe lîngă o compartimentare structurală există și o diferențiere funcțională între camera externă — delimitată de membrana externă și cea internă — și camera interioară sau spațiul intercristal [31]. Membrana externă este relativ permeabilă. Moleculele mici, cum ar fi moleculele substratelor, P_i-ul, adenin-nucleotidele, pot pătrunde în camera exterioară prin simplă difuzie. Membrana externă nu impune nici o barieră la pătrunderea sau la ieșirea moleculelor cu greutăți moleculare joase. Membrana internă este impermeabilă, imprimînd mitocondriei proprietățile unui osmometru perfect. Transportul unor molecule sau ioni prin membrana internă, translocarea lor, este un proces activ, care reclamă

ridicarea potențialului energetic al particulei [31]. Moleculele sau ionii translocați nu pot fi îndepărtați prin spălări, spre deosebire de moleculele pătrunse în mod pasiv în camera exterioară. În momentul biosintezei mitocondriei în sectorul impenetrabil sînt incluse un complement de coenzime, adenin-nucleotide, P_i, cationi, într-o proporție bine determinată. Ei nu pot fi schimbați cu cei externi [31].

Sub acțiunea a numeroși factori, fizici sau chimici, sistemul de membrane mitocondriale își pierde continuitatea. Sistemele catalitice exterioare membranelor sînt ușor pierdute. Mitocondriile pierd capacitatea de a efectua integral ciclul acizilor tricarboxilici înaintea pierderii activității fosforilante sau respiratorii. Cel mai complex subfragment mitocondrial este particula descrisă de Green [12], „ETP_H", capabilă să cupleze oxidarea NADH-ului și a succinatului cu sinteză de ATP. Ea nu mai posedă echipamentul enzimatic necesar efectuării oxidărilor din ciclul Krebs. Preparatul „ETP_H" cuprinde fragmente intacte de membrană internă, ceea ce demonstrează că activitatea fosforilantă reclamă integritatea numai a sistemului de membrane interne, și nu a mitocondriei.

Prin deteriorarea mai departe a structurii mitocondriei se obțin particule care mai posedă funcția de transportare a electronilor, dar nu și capacitatea de a conserva energia mobilizată la curgerea electronilor spre oxigenul molecular. Preparatul submitocondrial din inimă de bou, care catalizează oxidarea nefosforilantă a NADH-ului și a succinatului, este numit „ETP". O simplificare mai înaintată a acestor particule a dus la izolarea în formă omogenă la ultracentrifugare a unei particule cu o greutate moleculară de $2{,}1 \times 10^6$, care oxidează NADH-ul și succinatul cu o viteză mult mai mare decît „ETP". Se consideră că această particulă reprezintă o entitate morfologică și funcțională a mitocondriei și a fost numită „particulă elementară" [32]. Această particulă a fost identificată cu unitatea repetitivă a membranei interne, observată de Fernandez-Moran și colab. [33] prin electronomicrografie.

Prin tratarea mai drastică a particulelor respiratorii — extracție cu solvenți organici, tratare cu detergenți, digestie cu fosfolipază — lanțul respirator intact a fost scindat în sisteme catalitice mai simple, care efectuează transportul de electroni numai între anumiți componenți ai lanțului respirator [12], [32]. Un lanț respirator este alcătuit din patru complexe [12] și aceste complexe reprezintă, după Green și Hechter [32], cele mai mici părți funcționale în care lanțul poate fi scindat și apoi recombinat fără pierderea activității integrale de transport a electronilor. Fiecare complex este constituit din mai mulți componenți și are o funcție de transport limitată, care i-a determinat denumirea. Cele patru complexe sînt :

a) Complexul I, NADH-coenzimă Q-reductază, cuprinde NADH-dehidrogenază și o feroproteină (fier neheminic).

b) Complexul II, succinat-coenzimă Q-reductază, este alcătuit din succinat-dehidrogenază și fier neheminic.

c) Complexul III, coenzimă QH_2-citocrom *c*-reductază cuprinde citocrom *b*, fier neheminic și citrocrom c_1.

d) Complexul IV, citocrom-oxidază, cuprinde citocrom *a* și o cuproproteină.

Doi dintre componenții lanțului respirator sînt liberi — coezima Q și citocromul *c* — și se deplasează ușor de la un complex la altul, asigurînd o legătură funcțională între aceștia. Coenzima Q leagă funcțional complexele I și II de complexul III. Complexul III este legat prin citocromul *c* de complexul IV.

II. FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

Procesul prin care energia liberă mobilizată într-o reacție de oxidare este utilizată pentru sinteză de ATP din ADP și P_i a fost numit fosforilare oxidativă :

$$AH_2 + B + ADP + P_i \rightleftharpoons A + BH_2 + ATP$$

Există mai mulți precursori, însă ATP-ul este primul intermediar relativ mai stabil. Fosforilările oxidative sînt fie fosforilări cuplate cu oxidarea într-o singură etapă a unui substrat, fie fosforilări cuplate cu funcționarea lanțului transportor de electroni. Fosforilări din prima categorie sînt : sinteza de ATP cuplată cu oxidarea *3*-fosfo-gliceraldehidei și cea cuplată cu decarboxilarea oxidativă a α-cetoglutaratului. Fosforilări legate de lanțul respiraotr sînt acelea în care A și B sînt doi componenți ai lanțului respirator. Există mai multe cupluri în lanț la nivelul cărora energia procesului de oxidare este conservată în legăturile pirofosforice terminale ale ATP-ului. În literatura de specialitate, cînd nu se face nici o mențiune, prin fosforilare oxidativă se înțelege fosforilarea legată de funcționarea lanțului respirator.

A. Mecanismul fosforilării oxidative

Prima încercare de a defini o schemă de reacții pentru fosforilarea oxidativă este cea a lui Lipmann [34], care poate fi reprezentată prin ecuațiile :

$$AH_2 + P_i \rightleftharpoons AH_2 \cdot P$$
$$AH_2 \cdot P + B \rightleftharpoons A \sim P + BH_2$$
$$A \sim P + ADP \rightleftharpoons A + ATP$$

În această schemă, fosforilarea precedă reacția de oxidare.

În anii următori, Racker [35], studiind mecanismul reacției dehidrogenazei *3*-fosfo-gliceraldehidei, a observat un fapt important : legătura macroergică apare înaintea intervenției P -ului. Energia mobilizată în reacția de oxidare este conservată sub forma unei legături tiol-esterice. Urmează apoi transferul acestei legături în *1,3*-difosfo-glicerat, iar acesta din urmă furnizează energia pentru sinteză de ATP. Mecanismul fosforilării oxidative de la nivelul *3*-fosfo-gliceraldehid-dehidrogenazei poate fi reprezentat prin ecuațiile [36] :

$$\text{Enzimă} + NAD \rightleftharpoons \text{Enzimă} \cdot NAD$$
$$\text{Enzimă} \cdot NAD + R{-}CHO \rightleftharpoons E{-}S \sim CO{-}R + NADH + H^+$$
$$E{-}S \sim CO{-}R + P_i \rightleftharpoons \text{Enzimă} + R{-}CO \cdot O \sim P$$
$$R{-}CO \cdot O \sim P + ADP \rightleftharpoons R{-}COOH + ATP$$

Slater [37], [38], ținînd seama de aceste constatări, sugerează pentru fosforilarea oxidativă cuplată cu sistemul transportor de electroni un mecanism cuprinzînd două etape principale :

$$AH_2 + B + I \rightleftharpoons A \sim I + BH_2$$
$$A \sim I + P_i + ADP \rightleftharpoons A + I + ATP$$

În această schemă, A și B sînt doi componenți adiacenți de la un punct de fosforilare din lanțul respirator. I este un compus intermediar, nedefinit încă din punct de vedere chimic, care joacă rolul compusului tiolic din fosforilările de substrat. În lucrările inițiale ale lui Slater, [37], [38] s-a utilizat simbolul C, în locul simbolului I, pentru acest intermediar. Substituirea lui C prin I au făcut-o Chance și Williams [9], pentru a ilustra inhibarea respirației în prezența acestui compus. Schema dată de Slater pentru mecanismul fosforilării oxidative cuplate cu lanțul respirator a reprezentat o ipoteză de lucru fructuoasă. Ea a servit la explicarea multor observații și, la rîndu-i, a fost mereu adăugită și detaliată.

Separarea reacțiilor de oxidare și de fosforilare, așa cum propune schema .lui Slater [37], [38], era sprijinită în principal de două serii de observații : a) inhibiția respirației mitocondriilor intacte în absență de P_i și de ADP [39] și b) independența respirației de prezența P_i și a ADP în mitocondrii decuplate [40]. Lardy și Wellman [39] au observat că mitocondriile intacte, cînd sînt incubate în condiții optime de pH, de cofactori și de substrat, nu respiră pînă nu se adaugă P_i și ADP. Mai mult decît atît, consumul de oxigen încetează cînd P_i

şi ADP s-au transformat în ATP. De fapt, în loc de ADP în concentraţii de substrat, Lardy şi Wellman [39] au utilizat cantităţi catalitice de adenin-nucleotide, ADP sau ATP, în prezenţa unui sistem enzimatic care consumă ATP-ul şi asigură o concentraţie staţionară de ADP. S-au utilizat ca sisteme acceptoare de fosfaţi sistemele glucoză plus hexokinază şi creatină plus creatin-kinază. Schema lui Slater [37], [38] arată că pentru desfăşurarea reacţiei de oxidare este obligatorie prezenţă lui I. Or, acesta nu este liberat din intermediarul A ~ I decît după transferul legăturii macroergice pe ATP. Prezenţa de ADP (şi de P_i) în sistem va fi, la rîndul ei, obligatorie pentru desfăşurarea reacţiei de fosforilare cu viteză maximă. Gradul în care respiraţia este dependentă de prezenţa P_i şi ADP se măsoară prin raportul dintre viteza respiraţiei în prezenţă de ADP (sau în prezenţa unui sistem care regenerează ADP din ATP) şi viteza respiraţiei înaintea adăugării acceptorului de fosfat. Acest raport este numit control respirator sau indice al controlului respirator. Respiraţia va depinde de concentraţia P_i sau ADP, controlul respirator al preparatului va fi ridicat numai în măsura în care intermediarii fosforilării oxidative nu mai participă şi la alte reacţii. De exemplu, hidroliza intermediarului A~I (indusă prin diferiţi agenţi) va furniza continuu pe I, astfel că fluxul de electroni prin lanţul respirator va fi maxim chiar dacă lipsesc P_i sau ADP. O descompunere rapidă a lui A~I cîştigă în competiţia cu reacţia de fosforilare, respiraţia este maximă fără să aibă loc o sinteză netă de ATP. Energia lanţului respirator conservată sub formă de A~I este pierdută sub formă de căldură. Situaţia aceasta este cunoscută sub numele de decuplare a respiraţiei de fosforilare. *2,4*-dinitrofenolul este unul dintre primii agenţi a căror acţiune decuplantă a fost recunoscută. Loomis şi Lipmann [40] au demonstrat primii independenţa respiraţiei de prezenţa acceptorului de fosfat în mitocondrii tratate cu dinitrofenol.

Schema propusă de Slater [37], [38] a permis definirea a două situaţii particulare ale sistemelor fosforilante mitocondriale : controlul respirator şi decuplarea respiraţiei de fosforilare. În anii următori, această schemă a fost detaliată ; s-au adus evidenţe experimentale despre existenţa unui sistem catalitic responsabil de transferul energiei de la lanţul respirator la ATP independent de sistemul transportor de electroni. Vom aminti de la început cîteva din completările aduse acestei scheme, urmînd ca mai departe să prezentăm faptele pe care se bazează aceste modificări.

În prima etapă, etapa de conservare a energiei, pentru a se evita o reacţie trimoleculară între doi componenţi ai lanţului respirator şi I, se admite că au loc două reacţii parţiale [9], [41], [42], [43]. I se combină cu transportorul redus, dînd forma săracă în energie a lui $AH_2 \cdot I$. Potenţialul energetic al lui $AH_2 \cdot I$ este ridicat prin oxidarea lui AH_2 :

$$AH_2 + I \rightleftharpoons AH_2 \cdot I$$
$$AH_2 \cdot I + B \rightleftharpoons A \sim I + BH_2$$

Chance şi Williams [9] susţin că energia mobilizată în procesul oxido-reducător este înmagazinată mai degrabă în compuşi ai formelor reduse ale transportorilor cu I, conform reacţiilor :

$$B + I \rightleftharpoons B \cdot I$$
$$AH_2 + B \cdot I \rightleftharpoons A + BH_2 \sim I$$

Etapa a doua, fosforilantă, din schema iniţială a lui Slater a fost detaliată în alte trei reacţii parţiale [9], [41], [42], [43] : S-a introdus un al doilea intermediar, X, care intervine înaintea P_i-ului, iar reacţia finală de sinteză a ATP-ului este precedată de formarea unui alt compus fosforilat macroergic. Mecanismul de reacţie al fosforilării oxidative, adoptat astăzi de cei mai mulţi cercetători, poate fi redat prin ecuaţiile [9], [37], [38], [42] [43] :

$$AH_2 + I \rightleftharpoons AH_2 \cdot I$$
$$B + AH_2 \cdot I \rightleftharpoons A \sim I + BH_2$$
$$A \sim I + X \rightleftharpoons X \sim I + A$$

sau după Chance și Williams [9]:

$$B + I \rightleftharpoons B \cdot I$$
$$B \cdot I + AH_2 \rightleftharpoons BH_2 \sim I + A$$
$$BH_2 \sim I + X \rightleftharpoons X \sim I + BH_2$$

și mai departe:

$$X \sim I + P_i \rightleftharpoons X \sim P + I$$
$$X \sim P + ADP \rightleftharpoons X + ATP$$

Stări metabolice ale mitocondriilor. Componenții lanțului respirator suferă modificări ale gradului lor de oxidare atunci cînd echivalenții reducători curg de la substrat la oxigen. După viteza fluxului de electroni se pot defini mai multe stări metabolice, staționare, ale lanțului respirator [9], [44]. Fiecare stare staționară este caracterizată de o anume viteză a consumului de oxigen și de un anumit nivel de oxidare a transportorilor. În sistemele mitocondriale fosforilante, Chance și Williams [9], [44] au definit 5 stări staționare, fiecare stare avînd ca factor limitant de viteză un anume component. Pentru definirea unei stări staționare se determină simultan viteza consumului de oxigen — viteza fluxului de electroni prin lanț — și gradul de oxidare al fiecărui component. Se utilizează o suspensie aerată de mitocondrii, în soluție izotonică și tamponată cu fosfați.

Starea „1" se obține în absența vreunui alt adaos. Viteza consumului de oxigen este mică. Sistemul cuprinde doar substrate endogene, dar respirația este încă și mai redusă, datorită lipsei de ADP. Componenții lanțului respirator dinspre oxigen sînt oxidați, gradul de reducere al transportorilor crescînd treptat spre capătul dinspre substrat. La NADH se atinge un grad de reducere de aproximativ 90%.

Starea „2" se obține prin adăugarea de ADP mitocondriilor în starea „1". Adaosul de ADP este urmat de o perioadă scurtă de respirație rapidă pe seama substratelor endogene, după care se instalează o nouă starea staționară, starea „2" Viteza consumului de oxigen este joasă. Toți componenții lanțului respirator se află în stare oxidată în proporție de 100%.

Starea „3" este starea de respirație activă a mitocondriilor. Ea se obține prin suplimentarea mitocondriilor cu substrat exogen în exces și cu ADP. Viteza consumului de oxigen este mare, el fiind limitat numai de activitatea enzimelor respiratorii. Transportorii se află parțial reduși. Reducerea este gradată de-a lungul lanțului de la mai puțin de 4% la citocromul *a* la aproximativ 50% la NADH. Starea „3" durează pînă la epuizarea ADP-ului prin fosforilarea lui în ATP.

Starea „4" se instalează spontan cînd ADP-ul este fosforilat. Viteza respirației scade brusc, atingînd în unele preparate, în prezență de substrate NAD^+ dependente, 1/10 pînă la 1/13 din viteza respirației în starea „3". Starea „4" este o stare de repaus, factorul limitant de viteză fiind concentrația ADP-ului. Transportorii se află în proporție mare în stare redusă. Efectul este gradat de-a lungul lanțului de la starea de 100% oxidație a citocromului *a* pînă la starea de 100% reducere a NADH-ului.

Starea „5" se instalează cînd sistemul a devenit anaerob prin utilizarea oxigenului dizolvat în mediul de reacție. Viteza respirației este zero. În această stare, toți componenții lanțului respirator sînt complet reduși.

Dintre stările staționare ale lanțului respirator, cea mai interesantă este starea „4", de inhibiție a respirației în prezența unui exces de substrat și de oxigen. Factorul care limitează viteza consumului de oxigen este concentrația ADP-ului. Această stare este numită stare de repaus sau de control metabolic. Ea nu se poate instala decît în preparatele mitocondriale intacte.

Teoria încrucişării oxidărilor şi a reducerilor. Date importante privind mecanismul fosforilării oxidative au fost obţinute de Chance şi Williams [9], [44], [45] prin urmărirea modificărilor spectroscopice ale transportorilor de electroni la tranziţia de la starea „4" la starea „3" şi viceversa. Tranziţia de la starea „3" la starea „4" este o tranziţie de la o respiraţie activă, cuplată cu fosforilare, la o inhibiţie a respiraţiei prin încetarea fosforilărilor. Tranziţia de la starea „4" la starea „3" este o tranziţie de la repaus metabolic la fosforilare oxidativă activă. Un acelaşi preparat mitocondrial poate fi trecut alternativ în starea „3" şi în starea „4" prin adaosuri de cantităţi relativ mici de ADP.

Adaosul de ADP la mitocondrii în starea „4" iniţiază o respiraţie activă, întovărăşită de fosforilarea ADP-ului la ATP. Creşterea vitezei consumului de oxigen la iniţierea fosforilărilor ar putea fi rezultatul unui mecanism de activare a respiraţiei sau al unui mecanism de dezlegare a unei inhibiţii. Chance şi Williams [9] exclud prima alternativă, deoarece în sistemele nefosforilante viteza respiraţiei este mare, uneori mai mare decît în sistemele fosforilante, şi nu este mărită prin adaos de ADP. Se admite că, în absenţă de ADP, respiraţia este inhibată şi fosforilarea oxidativă include un mecanism pentru înlăturarea acestei inhibiţii [9].

Pentru a identifica cuplurile redox ale lanţului respirator, la nivelul cărora este inhibat transferul de electroni în starea „4", s-au cercetat mai întîi răspunsurile spectroscopice ale transportorilor dintr-un preparat mitocondrial după tratare cu antimicină A [9].

Antimicina A este un inhibitor puternic al respiraţiei mitocondriale. Prin adăugare de antimicină A la mitocondrii în starea „3", viteza consumului de oxigen scade la valori foarte mici şi transportorii de electroni suferă modificări caracteristice. Citocromii a_3, a şi c (citocromul c_1 nu este observabil în aceste condiţii) trec într-o stare de oxidaţie completă, pe cînd citocromul b, flavoproteina şi NAD^+-ul se reduc în proporţie de 100%. Prin urmare, trecerea de la starea activă „3" la starea de inhibiţie cu antimicină este întovărăşită de reacţii de reducere de la citocromul b înspre substrat şi de oxidări de la citocromul c la oxigen. Între citocromul b şi citocromul c are loc o încrucişare a oxidărilor şi a reducerilor. Antimicina interacţionează cu lanţul respirator în acest punct. Ea inhibă reducerea citocromului c^{3+} de către citocromul b^{2+}.

$$\text{cit. } c^{3+} + \text{cit. } b^{2+} \xrightarrow[\text{antimicină}]{} \text{cit. } c^{2+} + \text{cit. } b^{3+}$$

Prin urmare, la tranziţia la starea de inhibiţie cu antimicină s-a pus în evidenţă un cuplu redox, la nivelul căruia are loc o inversare a sensului fluxului de electroni. Componenţii care se află de o parte a acestui punct devin mai oxidaţi, iar cei care se află de partea opusă devin mai reduşi. Chance şi Williams [9] au definit acest punct ca punct de încrucişare (*cross-over point*). La nivelul unui punct de încrucişare are loc o inhibiţie sau o răsturnare a inhibiţiei fluxului de electroni.

Identificarea punctelor de încrucişare la tranziţia dintre stările „3" şi „4". Tranziţia lanţului respirator de la starea „3" la starea „4" este o tranziţie de la o stare de respiraţie activă la o stare de inhibiţie pronunţată a consumului de oxigen, inhibiţie indusă de încetarea fosforilărilor. Transportul de electroni prin lanţ va fi inhibat tocmai între cuplurile redox, la nivelul cărora oxidarea este cuplată cu fosforilarea. Prin analogie cu comportarea lanţului respirator faţă de antimicina A, punctele de inhibiţie vor putea fi identificate punînd în evidenţă un punct de încrucişare a oxidărilor şi a reducerilor la tranziţia de la starea „3" la starea „4" şi viceversa. În lanţul respirator intact au fost puse în evidenţă trei puncte de încrucişare, ceea ce demonstrează că există trei puncte de inhibiţie a respiraţiei, la care inhibiţia este răsturnată prin ADP. Aceste puncte sînt identificate cu punctele de fosforilare, de conservare a energiei. Prin

observație directă s-a identificat un punct de încrucișare între citocromul *a* și citocromul *c*; la tratarea mitocondriilor cu azidă s-au găsit un punct de încrucișare între citocromul *b* și citocromul *c* și un altul între NAD^+ și flavo-proteină [46]. Datorită existenței mai multor puncte de inhibiție, încrucișarea oxidărilor și a reducerilor produce un efect gradat de-a lungul lanțului. NAD^+, de la un grad de reducere de aproape 100% în starea „4", atinge în starea „3" un nivel de reducere de aproximativ 50%. Componentul cuplului redox la nivelul căruia are loc încrucișarea oxidărilor și a reducerilor, care se află înspre substrat, este locul de conservare a energiei. Asemenea componenți vor fi citocromul *c*, citocromul *b* și NADH [9].

Mecanismul inhibiției în starea „4". Conform teoriei *crossover*-ului, Chance și colab. [9], [47] explică în felul următor inhibiția și modificările spectroscopice care au loc la tranziția de la starea „3" la starea „4".

Se consideră un cuplu redox din lanțul respirator, cum ar fi cuplul citocrom *b* și citocrom *c*. O substanță notată cu I este prezentă în mitocondrii și se combină cu un component al lanțului respirator pentru a conserva o parte din energia procesului redox:

$$\text{cit. } b^{2+} + \text{cit. } c^{3+} + \text{I} \rightleftharpoons \text{cit. } c^{2+} \sim \text{I} + \text{cit. } b^{3+}$$

Pentru a se evita reacția trimoleculară se consideră că I este legat dinainte de transportor printr-o legătură săracă în energie:

$$\text{cit. } c^{3+} + \text{I} \rightleftharpoons \text{cit. } c^{3+} \cdot \text{I}$$
$$\text{cit. } c^{3+} \cdot \text{I} + \text{cit. } b^{2+} \rightleftharpoons \text{cit. } c^{2+} \sim \text{I} + \text{cit. } b^{3+}$$

Aceasta este reacția de conservare a energiei și este rapidă. Etapa limitantă de viteză se află între transportor $\sim$I și locul unde intervin P_i-ul și ADP-ul. Într-adevăr, la concentrații suficient de mari de ADP și de P_i, viteza de trecere de la starea „4" la starea „3", precum și viteza transferului de electroni prin lanț, devine independentă de concentrația ADP-ului și a P_i-ului. Se postulează de aceea intervenția unui alt intermediar, notat cu X, în reacția:

$$\text{cit. } c^{2+} \sim \text{I} + \text{X} \rightleftharpoons \text{X} \sim \text{I} + \text{cit. } c^{2+}$$

Urmează apoi reacțiile de fosforilare și de sinteză a ATP-ului, care sînt redate prin ecuația globală:

$$\text{X} \sim \text{I} + P_i + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{X} + \text{I} + \text{ATP}$$

În absență de ADP (în starea „4") se acumulează intermediarul citocrom $c^{2+} \sim$I și toată cantitatea de X este blocată sub formă de X$\sim$I. Citocromul *c* nu mai poate participa la transferul de electroni. Adaosul de ADP liberează pe X și acesta din urmă permite liberarea citocromului c^{2+} din forma inhibată. Creșterea concentrației citocromului c^{2+} inițiază o secvență de reacții în lanțul respirator: crește viteza reacției cu citocromul a^{3+} și se formează rapid citocrom c^{3+} și citocrom a^{2+}. Prin reacții adiționale se formează mult citocrom b^{3+} și citocrom a_3^{2+}. Creșterea concentrației ferocitocromului a_3 mărește viteza de reducere a oxigenului. Prin urmare, tranziția de la starea „4" la starea „3" crește viteza consumului de oxigen, mărește concentrația fericitocromului c^{3+} (care fusese inhibat sub formă de citocrom $c^{2+} \sim$I). Componenții dinspre oxigen, citocromii *a* și a_3, devin mai reduși, iar cei dinspre substrat, citocromul *b*, flavo-proteina și NADH, devin mai oxidați.

La celelalte puncte de fosforilare, la tranziție de la starea „4" la starea „3" au loc fenomene similare. În starea „4", citocromul *b* și NADH sînt blocați sub formă de citocrom $b^{2+} \sim$I și NADH$\sim$I. Tranziția de la starea „4" la starea „3" crește concentrația formelor oxidate ale componenților implicați. Transportorii dinspre oxidază devin mai reduși, iar cei dinspre dehidrogenază mai oxidați.

Rezultatele cercetărilor din Chance pot fi rezumate în schema [41] :

Etapa de conservare a energiei

$$\begin{array}{l} \text{succinat} \longrightarrow Fp_S \searrow \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\quad b \longrightarrow c_1 \longrightarrow c \longrightarrow a \longrightarrow a_3 \longrightarrow O_2 \\ \text{NADH} \longrightarrow Fp_D \nearrow \\ \quad \uparrow I_d \qquad\qquad \uparrow I_b \qquad\qquad \uparrow I_c \\ \text{NADH} \sim I_d \qquad b^{2+} \sim I_b \qquad c^{2+} \sim I_c \end{array}$$

Etapele de transfer al energiei

$$\begin{array}{l} 3 \text{ transportor} \sim I_{d,\,b,\,c} + 3\,X \rightleftharpoons 3\,X \sim I_{d,\,b,\,c} + 3 \text{ transportor} \\ 3\,X \sim I_{d,b,c} + 3\,P_i \rightleftharpoons 3\,X \sim P + 3\,I_{d,\,b,\,c} \\ 3\,X \sim P + 3\,ADP \rightleftharpoons 3\,X + 3\,ATP \end{array}$$

Evidenţe pentru existenţa formelor bogate în energie ale transportorilor. În mecanismul fosforilării oxidative postulat de Chance şi colab. [9], [47], unul din transportorii unui cuplu la nivelul căruia este conservată energia există într-o formă bogată în energie : NADH$\sim$I, citocrom $b^{2+}\sim$I şi citocrom $c^{2+}\sim$I. Spectroscopic s-au adus evidenţe pentru o formă de NAD^+ legat, care absoarbe diferit de NAD^+ sau de NADH, şi s-a admis că ar fi NADH$\sim$I [9], [48]. Pentru citocromi nu s-au putut distinge spectroscopic alte forme în afară de cea oxidată şi cea redusă. Recent, Chance şi Schoener [49] au introdus o tehnică nouă de cercetare a lanţului respirator : îngheţarea rapidă cu azot lichid a particulelor respiratorii şi măsurarea modificărilor spectroscopice ale componenţilor la trecerea de la o stare metabolică la alta. Cu ajutorul acestei tehnicii s-au observat modificări spectroscopice ale componenţilor lanţului respirator în raport cu starea energetică a lanţului. În cercetările anterioare [9], [41] se urmăreau modificările spectroscopice ale transportorilor prin variaţii ale fluxului de electroni prin lanţ. Tranziţia de la starea „3" la starea „4" şi viceversa este determinată de variaţii, de 5 pînă la 10 ori, ale vitezei fluxului de electroni. În tehnica introdusă acum [49] se minimalizează viteza de curgere a electronilor prin lanţ, dar se induc variaţii maxime ale stării energetice a lanţului respirator. Nu se adaugă substrat, sistemul transportor de electroni este blocat la capătul dinspre oxigen cu sulfură de sodiu, iar la capătul dinspre substrat cu malonat sau cu oxaloacetat. În aceste condiţii, adaosul de ATP inversează reacţiile de transfer al energiei şi apare o stare în care toţi componenţii implicaţi în acest transfer vor rămîne în formele lor bogate în energie. Adăugarea unui decuplant determină o tranziţie inversă a lanţului respirator. Formele bogate în energie ale componenţilor se descarcă şi sistemul trece din nou într-o stare săracă în energie. Chance şi Schoener [49], urmărind modificările spectroscopice care au loc după adăugare de ATP la mitocondrii tratate cu sulfură şi malonat (sau oxaloacetat), constată apariţia unui component neobservat pînă atunci, care absoarbe între citocromul *b* şi *c*, respectiv la 555 şi la 425 mμ. Adaosul decuplantului determină dispariţia compusului cu maximum de absorbţie la 555 şi 425 mμ. Din poziţiile benzilor de absorbţie, precum şi din raportul dintre maximele benzilor α şi γ, se conchide că noul component este un citocrom, cel mai probabil un derivat al citocromului *b*, pe care Chance şi Schoener [49] îl numesc compusul b_{555}. Condiţiile în care se formează şi dispare acest compus sugerează că el ar fi componentul citocrom $b^{2+}\sim$I, postulat încă din 1955 [9]. Apariţia compusului b_{555} în preparate submitocondriale libere de citocrom *c* [50] vine în sprijinul ipotezei că noul component este o formă a citocromului *b*, şi nu a citocromului *c*.

Reacţia de schimb ADP-ATP. Reacţia finală a fosforilării oxidative a fost studiată de Lehninger şi colab. [42], [43], [51]. Ei au izolat în stare de puritate înaintată o enzimă capabilă să încorporeze ADP-ul marcat cu P^{32} în ATP, în absenţă de transport de electroni. Enzima a fost numită enzima de schimb ADP—ATP. În timpul funcţionării lanţului respirator catalizează reacţia :

$$X \sim P + ADP \rightarrow ATP + X$$

Schimbul ADP-ATP este independent de concentrația P_i-ului, ceea ce indică faptul că fosfatul este încorporat într-un compus macroergic într-o reacție separată, care precedă încorporarea ADP-ului în ATP. De asemenea, reacția nu este sensibilă față de arsenat, cunoscut competitor al fosfatului, și nici față de dinitrofenol, al cărui punct de atac este una din reacțiile precedente.

B. Stoichiometria fosforilării oxidative și punctele de fosforilare din lanțul respirator

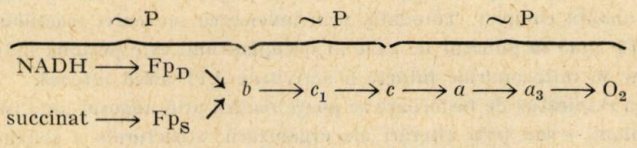
Engelhardt [52] a fost primul autor care a susținut ideea regenerării compușilor fosforilați prin procese oxidative. Această idee și-a găsit confirmarea, nu mult mai tîrziu, în experiențele lui Belitzer și Tsibakova [53] și ale lui Ochoa [54], care au observat esterificarea P_i-ului la degradarea aerobă a substratelor, esterificare independentă de fosforilările glicolitice.

Cîtul de fosforilare sau raportul P/O ca expresie a randamentului fosforilării oxidative a fost introdus de Ochoa [55]. El a calculat pentru oxidarea piruvatului în homogenate un raport P/O de 3, valoare care a fost confirmată ulterior pe mitocondrii.

Din gradientul de potențial de-a lungul lanțului respirator termodinamic au fost postulate trei puncte de fosforilare la trecerea unei perechi de atomi de hidrogen de la NADH la oxigenul molecular [34]. Aceste trei puncte se află între piridin-nucleotide și flavo-proteine, între citocromii *b* și *c* și între citocromul *a* și oxigen. Experimental s-a confirmat un punct de fosforilare între NADH și flavo-proteină, altul între citocromii *b* și c_1. Pentru cel de-al treilea punct de fosforilare există indicii că acesta s-ar afla mai degrabă între citocromul *c* și citocrom-oxidază decît între citocromul *a* și oxigen, cum rezultă din calculele termodinamice.

Experimental, punctele de-a lungul lanțului respirator, la nivelul cărora oxidarea este cuplată cu sinteză de ATP, au fost stabilite prin : a) măsurarea cîtului P/O la funcționarea unor porțiuni bine determinate din lanț și b) identificarea punctelor de conservare a energiei cu punctele de încrucișare a oxidărilor și a reducerilor, conform teoriei lui Chance și Williams [9].

Oxidarea NADH-ului exogen sau a celui generat intramitocondrial a dus la concluzia că de la NADH la oxigen au loc trei fosforilări [56]. Porțiunea lanțului transportor de electroni de la citocromul *b* la oxigen, care funcționează la oxidarea succinatului, generează două molecule de ATP [57]. Oxidarea citocromului *c* (redus neenzimatic cu ascorbat) dă cîturi P/O de maximum 1 [58], demonstrînd în acest fel prezența unui punct de cuplare de la citocromul *c* pînă la oxigen. Copenhaver și Lardy [57], utilizînd fericianura de potasiu ca acceptor final de electroni, obțin la oxidarea NADH-ului două fosforilări. Aceste cercetări au arătat că trecerea unei perechi de electroni de la NADH la oxigen este cuplată cu sinteza a trei molecule de ATP în regiunile indicate în schemă :



Chance și Williams [9] constată trei puncte de încrucișare a oxidărilor și a reducerilor la tranziția de la starea „3" la starea „4" și le identifică cu locurile unde energia mobilizată prin oxidare este utilizată pentru sinteză de ATP. Cele trei puncte de încrucișare se află între NADH și Fp_D, între citocromii *b* și *c* și între citocromii *c* și *a*.

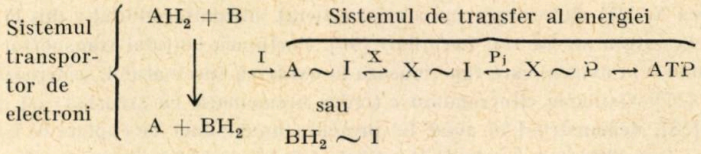
În ultimii ani, din diferite laboratoare au fost raportate cîturi de fosforilare mai mari decît acelea stabilite în experiențele pionierilor în acest domeniu. Gurban și Cristea [59], [60] au obținut cîturi mai mari decît 2 cu succinat, Howland [61] mai mari decît 1 cu ascorbat, iar Smith și Hansen [62] și Lynn și Brown [63] mai mari decît 3 cu substrate NAD^+ depen-

dente. Gurban şi Cristea [64], [65], [66], urmărind fosforilarea oxidativă în timp, au arătat că valorile ridicate ale cîturilor de fosforilare observate de ei [59], [60] rezultă din esterificarea unui exces de P_i în primele minute care urmează declanşării fosforilării oxidative. Koivusalo şi Slater [67], reluînd experienţele lui Smith şi Hansen [62], nu au putut obţine o eficienţă mai ridicată decît 3 moli de ATP per atom-gram de oxigen la oxidarea substratelor NAD^+ dependente. Prin utilizarea procedeului lui Gurban şi Cristea [59], [60], Koivusalo şi Slater [67] au confirmat desfăşurarea bifazică a consumului de fosfat şi au obţinut cu glutamat cîturi P/O mai mari decît 3 în primele minute. Koivusalo şi Slater [67] sugerează însă că adevărata eficienţă a fosforilării oxidative este dată de raportul dintre vitezele fosforilării şi respiraţiei după instalarea stării staţionare. Fosforilarea suplimentară din primele minute este în legătură cu istoria mitocondriilor.

C. Decuplanţi, inhibitori ai transportului de electroni şi inhibitori ai transferului de energie

Asupra lanţului respirator şi asupra fosforilărilor cuplate cu funcţionarea lui se pot exercita mai multe acţiuni : a) inhibarea transportului de electroni prin blocarea unuia dintre componenţii lanţului respirator ; b) inhibarea transferului de energie de la lanţul respirator la ATP şi c) decuplarea transportului de electroni de sinteza de ATP. Există agenţi care exercită în mod specific una din aceste acţiuni, dar alteori efecte multiple sînt produse de o singură substanţă.

Decuplanţi ai fosforilării oxidative. Conform concepţiei de control respirator, curgerea electronilor cu viteză mare prin lanţul respirator presupune descărcarea continuă a formelor bogate în energie ale transportorilor. Calea obişnuită de cheltuire a energiei mobilizate în lanţul respirator este utilizarea ei pentru sinteză de ATP din ADP şi P_i prin intermediul unui sistem catalitic, ATP-sintetazic, care poate fi formulat schematic astfel :



Agenţii decuplanţi determină risipirea energiei mobilizate prin transferul de electroni, înaintea utilizării ei pentru sinteză de ATP, prin promovarea hidrolizei rapide a intermediarilor. Consecinţa creării acestui debuşeu pentru energia lanţului respirator este stimularea respiraţiei în sistemele care au ca factor limitant concentraţia acceptorului de fosfat. În sistemele decuplate, fosforilarea este abolită complet. Totodată, prin inversarea secvenţei reacţiilor de transfer al energiei de la ATP pînă la punctul de atac al decuplantului este posibilă hidroliza ATP-ului. Decuplanţii induc în mitocondriile intacte o activitate ATP-azică intensă.

Decuplarea respiraţiei de fosforilare se poate realiza prin adaosul unui compus chimic — — agentul decuplant — sau prin alterări ale organizării structurale a sistemului responsabil de transferul energiei de la nivelul lanţului respirator pînă la ATP.

Primul compus a cărui acţiune a fost recunoscută ca o decuplare a respiraţiei de fosforilare a fost *2, 4*-dinitrofenolul (DNP). Din interrelaţiile dintre efectele DNP-ului, arsenatului şi ale oligomicinei s-a stabilit că DNP-ul decuplează respiraţia de fosforilare prin promovarea hidrolizei intermediarilor macroergici primari de la cele trei puncte de cuplare [68], [69].

Inhibitori ai transportului de electroni. Amitalul (acidul *5*-etil-*5*-izoamil-barbituric) inhibă puternic oxidările substratelor dependente de NAD^+ [70] şi numai la concentraţii relativ mari inhibă şi oxidarea succinatului [71]. Antimicina A este un inhibitor puternic al respi-

rației mitocondriale. Ea blochează transferul de electroni dintre citocromii *b* și *c* prin combinarea ei cu ferocitocromul *b* [9] Insecticidul rotenona, prin efectele sale asupra respirației, se aseamănă cu amitalul. În concentrații foarte mici blochează transferul de electroni de la substratele dependente de NAD^+ fără a afecta oxidarea succinatului [72].

Inhibitori ai transferului de energie. Compușii cu această acțiune blochează transferul de energie de la lanțul respirator spre ATP și inhibă respirația în mitocondriile intacte. Respirația rămîne inhibată în măsura în care nu apar reacții colaterale de cheltuire a energiei. Criteriul pentru recunoașterea unui inhibitor al transferului de energie este deblocarea inhibiției respirației, indusă de acest agent, printr-un decuplant. Acesta din urmă creează o supapă pentru descărcarea intermediarilor bogați în energie ai fosforilării oxidative. Oligomicina [73], guanidinele [74], [75], [76] și atractilozidul [77], [78] sînt agenți specifici pentru inhibiția transferului de energie.

Prezentat la redacție la 3 martie 1966

Laboratorul de chimie biologică, I.M.F., București

BIBLIOGRAFIE

1. Slater E. C., Advanc. Enzymol., **20**, 147 (1958).
2. Keilin D., Proc. roy. Soc. B., **98**, 312 (1925).
3. Goldberger R., Green D. E., în Boyer P. D., Lardy H. Myrbäck K., *The Enzymes*, vol. 8, New York, Academic Press, 1963, p. 81.
4. Paleus S., Paul K. G., în Boyer P. D., Lardy H. Myrbäck K., *The Enzymes*, vol. 8, New York, Academic Press, 1963, p. 97.
5. Yakushiji E., Okunuki K., Proc. Imp. Acad. (Tokyo), **17**, 38 (1941).
6. Keilin D., Soc. Biol., Réunion Plénière, 27 May 1927.
7. Keilin D., Hartree E. F., Proc. roy. Soc., B., **127**, 167 (1939).
8. Yonetani T., în Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., *The Enzymes*, vol. 8, New York, Academic Press, 1963, p. 41.
9. Chance B., Williams G. R., Advanc. Enzymol., **17**, 65 (1956).
10. Lemberg R., Advanc. Enzymol., **23**, 265 (1962).
11. Okunuki K., în Hayaishi O. *Oxygenases*, New York, Academic Press, 1962, p. 409.
12. Green D. E., *Proc. 5th Intern. Congr. Biochem., Moscow, 1961*, vol. 9, Londra, Pergamon Press, 1963, p. 9.
13. Griffiths D. E., Wharton D. C., J. biol. Chem., **236**, 1 857 (1961).
14. Singer T. P., în *First IUB/IUBS Symposium on Biological Structure and Function, Stockholm, 1960*, vol. 2, New York, Academic Press, 1961, p. 103.
15. Singer T. P., Minakami S., Ringler R. L., *Proc. 5th Intern. Congr. Biochem., Moscow*, 1961, vol. 5, Londra, Pergamon Press, 1963, p. 174.
16. Singer T. P., în Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., *The Enzymes*, vol. 7, New York, Academic Press, 1963, p. 345.
17. Minakami S., Ringler R. L., Singer T. P., J. biol. Chem., **237**, 569 (1962).
18. Ringler R. L., Minakami S., Singer T. P., J. biol. Chem., **238**, 801 (1963).
19. Minakami S., Cremona T., Ringler R. L., Singer T. P., J. biol. Chem., **238**, 1 529 (1963).
20. Watari H., Kearney E. B., Singer T. P., Basinski D., Hauber J., Lusty C. J., J. biol. Chem., **237**, PC 1 731 (1962).
21. Singer T. P., Kearney E. B., Massey V., Advanc. Enzymol., **18**, 65 (1957).
22. Singer T. P., Kearney E. B., în Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., *The Enzymes*, vol. 7, New York, Academic Press, 1963, p. 383.
23. Wang T. Y., Tsou C. L., Wang Y. L., Sci. Sinica, Peking, **5**, 73 (1956).
24. Kearney E. B., Singer T. P., J. biol. Chem., **219**, 963 (1956).
25. Hatefi Y., Advanc. Enzymol., **25**, 275 (1963).
26. Hatefi Y., Lester R. L., Crane F. L., Widmer C., Biochim. biophys. Acta, **31**, 490 (1959).
27. Hatefi Y., Biochim. biophys. Acta, **34**, 183 (1959)

28. Hatefi Y., Biochim., biophys. Acta, **31**, 502 (1959).
29. Estabrook R. W., J. biol. Chem., **230**, 735 (1958).
30. Palade G. E., în Gaebler O. H, *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, New York, Academic Press, 1956, p. 185.
31. Brierley G., Green D. E., Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **53**, 73 (1965).
32. Green D. E., Hechter O., Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **53**, 318 (1965).
33. Fernandez-Moran H., Oda T., Blair P. V., Green D. E., J. cell. Biol., **22**, 63 (1964).
34. Lipmann F., în Gaebler O. H., *Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, New York, Academic Press, 1956, p. 444.
35. Racker E., în McElroy E. W., Glass B., *The Mechanism of Enzyme Action*, Baltimore, Johns Hopkins Press, 1954, p. 464.
36. Racker E., Avdanc. Enzymol., **23**, 323 (1961).
37. Slater E. C., Nature, Lond., **172**, 975 (1953).
38. Slater E. C., *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem., Brussels, 1955*, p. 264.
39. Lardy H. A., Wellman H., J. biol., Chem., **195**, 215 (1952).
40. Loomis W. F., Lipmann F., J. biol. Chem., **173**, 807 (1948).
41. Chance B., J. biol. Chem., **234**, 1 563 (1959).
42. Lehninger A. L., Wadkins C. L., Cooper C., Devlin T. M., Gamble J. L., Science, **128**, 450 (1958).
43. Lehninger A. L., *The Mitochondrion: Molecular Basis of Structure and Function*, New York, W. A. Benjamin, Inc., 1964.
44. Chance B., Williams G. R., J. biol., Chem. **217**, 409 (1955).
45. Chance B., Williams G. R., J. biol., Chem., **217**, 429 (1955).
46. Chance B., Williams G. R., J. biol. Chem., **221**, 477 (1956).
47. Chance B., Williams G. R., Holmes W. F., Higgins J., J. biol. Chem., **217**, 439 (1955).
48. Chance B., Baltschefsky J., J. biol. Chem., **233**, 736 (1958).
49. Chance B., Schoener B., J. biol. Chem., sub tipar.
50. Chance B., Lee C. P., Schoener B., J. biol., Chem., sub tipar.
51. Lehninger A. L., Bull. Soc. Chim. biol., **46**, 1 555 (1964).
52. Engelhardt V. A., Biochem. Z., **227**, 16 (1930).
53. Belitzer V. A., Tsibakova E. T., Biohimia, **4**, 516 (1939).
54. Ochoa S., J. biol., Chem., **138**, 751 (1941).
55 Ochoa S., J. biol. Chem., **151**, 493 (1943).
56. Lehninger A. L., J. biol. Chem., **190**, 345 (1951).
57. Copenhaver J. H., Lardy H. A., J. biol. Chem., **195**, 225 (1952).
58. Nielsen S. O., Lehninger A. L., J. biol. Chem., **215**, 555 (1955).
59. Gurban C., Cristea E., St. cerc. biochim., **4**, 551 (1961).
60. Gurban C., Cristea E., St. cerc. biochim., **5**, 415 (1962).
61. Howland J. L., Biochim. biophys. Acta, **77**, 419 (1963).
62. Smith A. L., Hansen M., Biochem. biophys. Res. Commun., **15**, 431 (1964).
63. Lynn W. S., Brown R. H., Biochim. biophys. Acta, **105**, 15 (1965).
64. Gurban C., Cristea E., St. cerc. biochim., **5**, 423 (1962).
65. Gurban C., Cristea E., Rev. roum. Biochim., **1**, 51 (1964).
66. Gurban C., Cristea E., Biochim. biophys. Acta, **96**, 195 (1965).
67. Koivusalo M., Slater E. C., Biochem. Z., **342**, 346 (1965).
68. Huijing F., Slater E. C., J. Biochem (Tokyo), **49**, 493 (1961).
69. Estabrook R. W., Biochem. biophys. Res. Commun., **4**, 89 (1961).
70. Jalling O., Lindberg O., Ernster L., Acta chim. scand., **198**, 9 (1955).
71. Pumphrey A. M., Redfearn E. R., Biochim. biophys. Acta, **74**, 317 (1963).
72. Ernster L., Dallam G., Azzone G. F., J. biol. Chem., **238**, 1 124 (1963).
73. Lardy H. A., în *First IUB/IUBS Symposium on Biological Structure and Function Stockholm, 1960*, vol. 2, New York, Academic Press, 1961, p. 265.
74. Pressman B. C., J. biol. Chem., **238**, 401 (1963).
75. Chappell J. B., J. biol. Chem., **238**, 410 (1963).
76. Chance B., Hollunger G., J. biol. Chem. **238**, 432 (1963).
77. Bruni A., Contessa A. R., Luciani S., Biochim. biophys. Acta, **60**, 301 (1962).
78. Vignais P. V., Vignais P. M., Stanislas E., Biochim. biophys. Acta, **60**, 284 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 1, 69–82 (1967)

PROTEINELE CEREBRALE

MIHAIL ŞERBAN

577.11

Prezentarea problemei şi importanţa ei. Cercetarea substanţelor proteice din creier constituie una din problemele de actualitate ale biochimiei contemporane. Cercetarea proteinelor cerebrale este justificată, după părerea noastră, atît de necesitatea cunoaşterii tot mai aprofundate a naturii şi a însuşirilor acestor componente plastice ale materiei vii ajunse la cel mai înalt grad de organizare, cît şi de necesitatea precizării rolului biochimic pe care pot să-l joace în cadrul diferitelor procese ale activităţii nervoase superioare.

Deşi substanţele proteice din creier au format de-a lungul anilor subiectul de studiu al multor cercetători şi cu toate că cercetările moderne le acordă o importanţă deosebită, totuşi cunoştinţele de care dispunem în acest domeniu sînt încă destul de limitate [1–4]. De aceea, investigarea substanţelor proteice din creier se impune astăzi în mod necesar, actualitatea ei fiind condiţionată în bună măsură şi de evoluţia mijloacelor moderne de investigaţie. Într-adevăr, în decursul ultimilor ani, studiul proteinelor cerebrale, ca de altfel biochimia sistemului nervos în general, a cunoscut un reviriment remarcabil, mai ales dacă luăm în considerare faptul că acest aspect al neurochimiei a rămas mult timp stagnant.

În această ordine de idei, trebuie menţionat că cercetarea substanţelor proteice din creier a fost influenţată de o serie de dificultăţi care au constituit impedimente în evoluţia cunoştinţelor noastre în această direcţie. Aceste dificultăţi sînt legate de însăşi natura, de complexitatea proteinelor cerebrale, precum şi a mediului în care ele subzistă, de interacţiunea lor structurală cu alţi compuşi biochimici, de marea lor labilitate; de asemenea, trebuie luată în considerare, ca unul din factorii importanţi care justifică într-un anumit grad stagnarea şi neeficienţa cercetărilor anterioare, lipsa instrumentelor de investigaţie adecvate, respectiv a metodelor de prelucrare şi analiză a proteinelor cerebrale. La acestea se mai adaugă, în fine, concepţia care a dominat încă de la primele încercări de izolare a proteinelor cerebrale, concepţie după care aceste proteine ar fi inerte din punct de vedere biochimic şi funcţional.

Dezvoltarea tehnicii biochimice de laborator din ultimii ani şi aplicarea metodelor moderne la cercetarea proteinelor cerebrale au determinat progrese evidente în cunoaşterea lor mai aprofundată, creîndu-se totodată premisele unei noi orientări în privinţa rolului şi participării proteinelor cerebrale la dinamica biochimică. Menţionăm că în ultimii ani cercetarea substanţelor proteice solubile din creier a intrat în preocupările a numeroase centre ştiinţifice, ceea ce atestă actualitatea şi importanţa la nivel de cercetare ştiinţifică mondială a acestei probleme. Majoritatea cercetărilor ce se efectuează în această direcţie sînt îndreptate spre lămurirea unor aspecte în legătură cu constituţia, natura,

însuşirile şi metabolismul proteinelor cerebrale, în vederea stabilirii bazelor biochimice ale participării lor în procesele complexe ale activităţii nervoase.

În lumina acestor considerente generale, problema cercetării proteinelor cerebrale solubile a fost abordată şi în cadrul Institutului de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România. Abordarea acestei probleme de către noi s-a făcut de pe o poziţie principial nouă, şi anume aceea a biochimiei comparate.

I. ISTORICUL PROBLEMEI

Din punct de vedere istoric, evoluţia cercetărilor legate de proteinele cerebrale în ansamblu s-ar putea diviza în trei etape principale, şi anume :

A. Prima etapă datează de la finele secolului al XIX-lea şi cuprinde perioada pînă în jurul anilor 1917—1920. În această etapă se înscriu primele încercări de izolare a proteinelor cerebrale şi de descriere a unora din proprietăţile lor fizico-chimice. Este demn de semnalat faptul că, cu toată imperfecţiunea tehnicilor de lucru şi a metodelor de investigare, inerentă începutului, totuşi în această perioadă au fost stabilite unele date importante privind compoziţia proteinelor cerebrale, date care au fost ulterior confirmate şi completate.

B. A doua etapă cuprinde perioada 1920—1954. În acest interval se înregistrează o dezvoltare importantă a biochimiei creierului atît din punctul de vedere al stabilirii compoziţiei acestuia în cele mai variate componente biochimice, cît şi din punctul de vedere al metabolismului acestora, al descrierii rolului lor funcţional. În mod surprinzător însă faţă de această dezvoltare, proteinele cerebrale au fost foarte puţin investigate. Cercetările în această direcţie sînt disparate şi nu aduc date deosebit de importante faţă de cele cunoscute în etapa anterioară. Totuşi este de remarcat că, paralel cu lucrări legate de compoziţia chimică a proteinelor cerebrale, încep să apară şi să se consolideze unele cercetări care abordează problema metabolismului acestor proteine.

C. A treia etapă începe cu cel de-al cincilea deceniu al secolului nostru şi inaugurează o perioadă de avînt în cercetarea multilaterală a proteinelor cerebrale. Caracteristica esenţială a acestei etape o constituie introducerea unor metode şi tehnici moderne în investigarea proteinelor din creier. Acest fapt a determinat abordarea pe un front mai larg şi mai complex a cercetării proteinelor cerebrale, mărirea eficienţei cercetărilor şi, implicit, un progres în acest domeniu, comparativ cu etapele precedente. Paralel cu studierea compoziţiei şi a unor proprietăţi ale proteinelor din creier, o largă extindere capătă cercetarea anumitor aspecte ale metabolismului lor, prin folosirea în special a radioizotopilor. Se fac de asemenea investigaţii în legătură cu modificările proteinelor cerebrale sub influenţa diferiţilor factori şi în dependenţă de anumite stări fiziologice ale organismului. Cu toate acestea, cunoştinţele dobîndite în ultimii ani asupra proteinelor cerebrale în general nu permit deocamdată conturarea în suficientă măsură a rolului lor în procesele specifice sistemului nervos central.

Considerăm că aplicarea cercetărilor de biochimie comparată la studiul proteinelor cerebrale poate să arunce o lumină nouă şi să contribuie la conturarea rolului acestor proteine, la stabilirea caracterului şi sensului proceselor metabolice la nivelul substanţelor proteice, în dependenţă de activitatea funcţională tot mai complexă a creierului, o dată cu evoluţia lui onto- şi filogenetică. În acest sens, caracteristicile proteinelor cerebrale solubile pe care noi le-am semnalat în scara filogenetică a creierului [4—10] ar putea avea un anumit ecou asupra evoluţiei metabolismului proteic în funcţie de verigile lanţului filogenetic, studiate în cadrul legăturii lor cauzale. Cercetarea comparativă a naturii şi a proprietăţilor proteinelor cerebrale în general, ca şi stabilirea corelaţiei cu metabolismul proteic specific treptei de evoluţie respective, ar putea constitui o premisă a cercetărilor ce se efectuează în domeniul proteinelor cerebrale în etapa actuală.

II. A. PROTEINE CEREBRALE SOLUBILE

Încă la finele secolului trecut, Danilevski (citat după [4]) a întreprins o serie de cercetări sistematice asupra extracției și compoziției proteinelor din creier. Acestui autor îi revine meritul de a fi încercat să coreleze compoziția proteinelor din creier cu vîrsta animalelor și cu funcțiile creierului, anticipînd astfel asupra rolului pe care proteinele cerebrale par să-l aibă în activitatea sistemului nervos. Elaborînd o schemă de scindare a proteinelor, Danilevski a arătat că proteinele sistemului nervos pot fi împărțite în cîteva grupe, cărora le-a atribuit următoarele denumiri: albumină, globulină, stromină, nucleină și cheratină. Utilizînd medii de extracție diferite, el a considerat că albuminele s-ar extrage în apă distilată, iar globulinele în medii apoase, saline sau amoniacale.

Cîțiva ani mai tîrziu (1894), Halliburton (citat după [4]), prin extracții cu soluții saline ale țesutului cerebral, menționează obținerea a trei substanțe proteice, dintre care — după părerea autorului — una ar fi o nucleoproteidă, iar celelalte de natură globulinică. Acidul nucleic care intră în constituția nucleoproteidei izolate după acest procedeu este identic cu acizii nucleici existenți în celelalte țesuturi.

Printre primele investigații efectuate asupra izolării proteinelor cerebrale solubile, un loc important ocupă și cercetările lui Mc. Gregor [4]. Acesta a descris o metodă pentru obținerea proteinelor delipidate în stare uscată din sistemul nervos. În condițiile descrise, Mc. Gregor a izolat trei fracțiuni proteice, și anume: *a*) proteine solubile în apă distilată, reprezentînd aproximativ 5% din greutatea uscată a creierului; acestea conțin fosfor și fier, precipită la adăugare de sulfat de amoniu și coagulează la căldură; *b*) proteine extrase în soluții alcaline diluate, care reprezintă aproximativ 10% din greutatea uscată a țesutului cerebral, conținînd de asemenea fosfor și fier; *c*) în fine, al treilea grup de substanțe proteice din creier este reprezentat de partea țesutului cerebral insolubilă în extractanți neutri, acizi sau alcalini; aceste proteine „de suport" cuprind aproximativ 20% din greutatea uscată a creierului.

În 1932, Block [4], extrăgînd țesutul cerebral cu glicerină și apoi precipitînd cu acetonă, obține trei substanțe proteice: proteina solubilă, nucleoproteida și neurocheratina.

După o îndelungată întrerupere, cercetarea substanțelor proteice solubile din creier a fost reluată de către Palladin. S-au pus, în primul rînd, bazele cercetării mai raționale a izolării proteinelor solubile din creier, prin stabilirea unor condiții riguroase de extracție a acestora.

Extracția proteinelor cerebrale solubile. În cercetările inițiale efectuate asupra proteinelor solubile din creier s-au folosit pentru extracția acestora, așa cum am arătat mai sus, apa distilată, soluții saline sau alcaline de hidroxid. Primele cercetări sistematice asupra extracției proteinelor din creier au fost întreprinse în 1947 de către Palladin și Goriuhina (citat după [11]), care au stabilit influența pH-ului asupra extracției proteinelor solubile, realizînd totodată o extragere fracționată a acestora. Au fost supuse extracției proteinele din substanța cenușie și albă a creierului de bou, folosindu-se ca extractanți: apă distilată; soluție de KCl 4,5% în tampon bicarbonat cu pH 9,1; soluție de KCl 4,5% în tampon acetat cu pH 4,5—5,0; soluție de carbonat de sodiu 0,1% și soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N. Aplicîndu-se această extracție fracționată, s-a arătat că conținutul în proteine solubile al substanței cenușii este mai mare decît cel al substanței albe. Prin extracție cu apă, din substanța cenușie se izolează proteine solubile reprezentînd aproximativ 30% din totalul substanțelor cu azot, pe cînd din substanța albă se obțin abia 19%. Extracția cu soluție de KCl 4,5% (pH 9,1) nu indică diferențe cantitative semnificative ale proteinelor izolate din substanța cenușie și albă. Un rezultat similar se obține și prin folosirea ca mediu de extracție a hidroxidului de sodiu 0,1 N, în care caz substanțele proteice izolate din substanța cenușie și albă se află într-un raport cantitativ aproape egal (36,3% față de 34,7%). Comparînd rezultatele obținute prin extracția proteinelor din creier cu hidroxid de sodiu și cu carbonat de sodiu,

autorii citaţi au conchis că ultimul extractant poate să-l înlocuiască pe primul : soluţia de carbonat de sodiu extrage cu aproximaţie aceeaşi cantitate de proteine ca şi soluţia mult mai alcalină de hidroxid de sodiu.

Problema extracţiei proteinelor din creier a fost reluată pe un alt plan cu zece ani mai tîrziu. Astfel, în 1957, Poliakova şi Gotovţeva [12] au cercetat condiţiile optime de extracţie a proteinelor cerebrale solubile, atît din punctul de vedere al randamentului, cît şi al separării lor ulterioare prin electroforeză pe hîrtie. Au fost utilizate ca medii de extracţie o serie de soluţii tampon, ca : succinat, acetat, veronal-medinal, borat, precum şi soluţii de clorură de sodiu (fiziologică), de clorură de potasiu 1,15% şi, în fine, apă distilată, într-un interval de pH cuprins între 3,6 şi 9,2. Pe baza datelor obţinute atît ca randament, cît şi ca separare electroforetică, s-a conchis că extracţia proteinelor cerebrale cu soluţie fiziologică de clorură de sodiu conduce la cele mai bune rezultate. Deşi cu tamponul veronal-medinal sau cu tamponul borat, folosite ca mediu de extracţie, se obţine o cantitate de proteine ceva mai mare, totuşi aceste soluţii nu sînt adecvate pentru cercetarea ulterioară a proteinelor prin metoda electroforetică. Din datele prezentate de aceiaşi autori rezultă şi faptul că cantitatea de proteine cerebrale extrase depinde de valoarea pH-ului mediului de extracţie, randamentul optim fiind în apropierea pH-ului neutru sau peste această valoare.

Mai recent, în 1959, Le Baron şi Folch-Pi [13] au cercetat influenţa pH-ului şi a concentraţiei ionice asupra extracţiei proteinelor solubile şi lipoproteidelor din creier. Extracţiile au fost efectuate cu soluţii saline netamponate, de forţă ionică pînă la 5,1, şi cu soluţii avînd valori ale pH-ului cuprinse între 4 şi 11 şi forţă ionică egală cu 3,0. S-a arătat că atît în substanţa albă, cît şi în cea cenuşie cantităţile maxime de azot şi de fosfor precipitabile cu acid tricloracetic au fost realizate la o forţă ionică a mediului de extracţie egală cu 2,0—2,5 şi la valori ale pH-ului cuprinse între 6 şi 9. Dializa extractelor cu soluţie netamponată de clorură de sodiu 3 M a indicat că o cantitate relativ mică de „albumine" libere de lipide rămînea în soluţie, pe cînd „globulinele" precipitate conţineau circa 25% lipide. Un sfert din aceste lipide este reprezentat prin colesterol. Preparate similare s-au obţinut atît din substanţa cenuşie, cît şi din cea albă a creierului, deşi cantităţile totale din substanţa cenuşie sînt considerabil mai ridicate.

Ca o concluzie la problema extracţiei proteinelor cerebrale acvosolubile, trebuie subliniat faptul că, deşi au fost aduse o serie de precizări importante în această direcţie, totuşi condiţiile de extracţie nu sînt încă standardizate sau generalizate. De aceea şi rezultatele obţinute de diferiţi cercetători sînt dificil de corelat, din cauza diversităţii metodelor şi condiţiilor de extracţie aplicate pentru fiecare caz. Un fapt este de reţinut însă, şi anume că pentru extracţia şi cercetarea ulterioară a proteinelor cerebrale acvosolubile, în special pentru separarea lor în cîmp electric, utilizarea soluţiilor saline netamponate (clorură de sodiu) ca mediu de extracţie pare a fi cea mai adecvată.

O serie de date noi au fost aduse de către Palladin [11] prin descrierea unor proprietăţi fizico-chimice ale proteinelor din creier, obţinute în diferite medii de extracţie. Aşa, de exemplu, solubilizarea proteinelor cerebrale diferă în funcţie de agentul extractant : proteinele extrase în mediu apos se solubilizează uşor atît în soluţii slab acide, cît şi în soluţii alcaline, cele extrase cu clorură de potasiu 4,5% la pH 9,1 sînt solubile numai în mediu slab alcalin, iar cele extrase cu hidroxid de sodiu sînt solubile în alcalii şi acizi slabi. Substanţele proteice izolate cu aceşti agenţi de extracţie atît din materia cenuşie, cît şi din cea albă a creierului diferă şi prin punctul lor izoelectric. Astfel, această constantă se găseşte la pH 4,6 pentru proteinele extrase cu apă distilată, la pH 5,6 pentru cele extrase cu clorură de potasiu şi la pH 5,2—5,3 pentru cele extrase în mediu de hidroxid. Valorile diferite ale acestei constante sînt determinate astfel de condiţiile de extracţie, proteinele izolate deosebindu-se prin proprietăţile lor fizico-chimice.

Efectuînd extracţii cu soluţii saline apoase, la diferite pH-uri şi puteri ionice, Porter şi Folch [14] au separat din creier trei fracţiuni proteice conţinînd cupru; dintr-una din aceste fracţiuni, extrasă în tampon acetat la pH 4,5, s-a obţinut un preparat purificat 85%, omogen la ultracentrifugare şi care conţine 0,25—0,5% cupru.

Electroforeza proteinelor cerebrale. Cunoştinţele asupra proteinelor cerebrale au fost îmbogăţite în ultimii ani prin aplicarea metodei electroforetice, în diversele ei variante, la cercetarea acestor proteine. Este de menţionat că marea majoritate a cercetărilor moderne efectuate în acest domeniu sînt bazate pe separarea în cîmp electric a proteinelor cerebrale acvosolubile [15].

Primele încercări de aplicare a electroforezei în cercetarea proteinelor cerebrale datează din anul 1954 [16]. Printre cercetările iniţiale în această direcţie se pot considera şi cele efectuate de Palladin şi Poliakova [17], care au studiat, prin metoda electroforezei pe hîrtie, proteinele diferitelor segmente ale sistemului nervos central la pisică. Proteinele solubile din creier, obţinute prin extracţie cu soluţie salină fiziologică, au fost supuse separării electroforetice, folosindu-se tamponul veronal de pH 8,6. Autorii găsesc, în condiţiile respective, un număr de 8 fracţiuni principale în extractele tuturor părţilor investigate din creier (substanţa cenuşie şi albă a emisferelor, a cerebelului şi a măduvei), precum şi o variaţie cantitativă a diferitelor fracţiuni; autorii semnalează însă şi existenţa unor fracţiuni suplimentare în extractele proteice ale unor părţi ale sistemului nervos central. Menţionăm, de asemenea, lucrarea publicată concomitent de către Hofmann şi Schinko [18], care au cercetat prin aceeaşi metodă proteinele din creierul de şobolan, precum şi din creierul de om, în stare normală şi cu tumori. În acest caz au fost semnalate 9 fracţiuni proteice, dintre care una prezintă o mobilitate mai mare decît a albuminei serice, o aşa-zisă fracţiune prealbuminică.

O serie întreagă de cercetări ulterioare au fost consacrate electroforezei proteinelor din creier. În multe cazuri însă, rezultatele sînt oarecum dificil de corelat, datorită condiţiilor diferite de extracţie şi de prelucrare a materialului biologic, precum şi condiţiilor variate de migrare folosite de autori, cu alte cuvinte, deci, inexistenţei unei metodici de lucru standardizate. Astfel, în afară de primele lucrări citate, menţionăm cu titlu informativ că pentru extracţia proteinelor cerebrale în vederea separării lor electroforetice, s-au folosit ca medii de extracţie: tamponul Michaelis de pH 8,1 [19], zaharoza 0,25 M [20], tamponul de fosfaţi (pH 7,2) cu forţă ionică mare (0,1—0,5) [20], amestecul de acetonă-eter pentru delipidarea proteinelor [21], tamponul veronal (pH 8,6) [22] etc. Gent [23] a propus folosirea lizolecitinei pentru solubilizarea şi clarificarea [24] omogenatelor de creier, în vederea cercetării electroforetice a proteinelor extrase. De asemenea, mediile de separare electroforetică folosite de diferiţii autori au fost şi ele diferite. Se poate cita astfel, printre altele, folosirea tamponului $H_3BO_3—Na_2SO_4$ (pH 8,6; $\mu = 0,06$) [19], a tamponului fosfat (pH 7,2; $\mu = 0,1—0,05$) [20], a tamponului veronal (pH 8,6) etc. Robertson [25] efectuează separarea electroforetică a extractului proteic folosind diferite soluţii tampon, ca fosfat, borat, trietanolamină şi glicină, scoţînd în evidenţă faptul că rezultate mai bune se obţin prin utilizarea tamponului pe bază de veronal, la pH 8,6.

Cercetările efectuate în acest domeniu au utilizat, în marea majoritate a cazurilor, electroforeza în mediu poros, respectiv pe hîrtie. Astăzi este unanim admis că prin electroforeza pe hîrtie sau în fază liberă proteinele solubile din creierul animalelor superioare (mamifere) se fracţionează în 8—10 componente [3], [5], [26], [27].

În ultimii ani se remarcă introducerea şi extinderea la studiul proteinelor cerebrale a electroforezei în geluri — în special în gelurile de amidon şi de poliacrilamidă —, medii cu proprietăţi deosebite, care le conferă o înaltă putere de rezoluţie [28—37]. În aceste condiţii s-au putut pune în evidenţă 15—30 de tipuri de proteine cerebrale. Se semnalează totodată utilizarea, în cercetarea proteinelor cerebrale solubile, a unei alte metode moderne, şi anume a cromatografiei pe schimbători de ioni celulozici (tip DEAE) [31—33], [36]. Men-

ţionăm, cu titlu informativ, că prin aplicarea combinată a acestei metode cu electroforeza în gel de amidon, şi mai ales în gel de poliacrilamidă, s-au înregistrat rezultate spectaculoase, proteinele cerebrale fracţionîndu-se în 70—100 de componente [33], [36], fapt care atestă o ultramicroeterogenitate a acestor proteine.

Pe baza acestor date contribuţiile pe care cercetările electroforetice le-au adus la cunoaşterea proteinelor cerebrale pot fi sistematizate astfel:

— s-a stabilit că, în raport cu proteinele altor organe sau lichide biologice, proteinele solubile din creier prezintă o complexitate cu mult mai mare, respectiv o mare eterogenitate în diferite tipuri de proteine;

— raporturile cantitative ale fracţiunilor proteice din creier sînt deosebite faţă de cele din alte ţesuturi; grupul fracţiunilor de albumine-prealbumine reprezintă aproximativ numai 5—10% din totalul fracţiunilor separate, restul fiind constituit din fracţiunile care corespund ca mobilitate globulinelor serice; din punctul de vedere al repartiţiei cantitative, grupul fracţiunilor proteice din creier situat în zona *beta*-globulinelor serice este cel mai evident exprimat;

— majoritatea fracţiunilor proteice din creier obţinute prin separare în cîmp electric sînt analoge ca mobilitate electrică fracţiunilor albumină, *alfa*-, *beta*- şi *gamma*-globulinice ale proteinelor serice; două sau trei fracţiuni migrează cu viteza serum-albuminei sau ceva mai mare, constituind în acest caz grupul fracţiunilor albumine-prealbumine;

— cercetări personale [6—8] au dovedit că diferitele tipuri de proteine cerebrale manifestă caractere de solubilitate salină apropiate, ceea ce reflectă, într-un anumit grad, structura lor superficială; după proprietăţile lor de solubilitate salină, majoritatea tipurilor de proteine cerebrale prezintă o proporţie şi o repartiţie destul de asemănătoare a grupărilor polare hidrofile; datele obţinute de noi au dovedit că anumite tipuri de proteine cerebrale, denumite în mod arbitrar „albumine" sau „globuline", prin analogie cu ordinul de mobilitate electroforetică a fracţiunilor serice, nu pot fi încadrate riguros în aceste grupe după proprietăţile lor de solubilitate (salifiere şi desalifiere);

— prin cîteva lucrări s-a dovedit că diferitele fracţiuni ale proteinelor solubile din creier reprezintă complexe conţinînd lipide, acizi nucleici sau polizaharide; cercetările noastre au semnalat că complexele glicoproteice din creier, spre deosebire de cele lipoproteice, se caracterizează printr-o mare eterogenitate [4];

— cercetările electroforetice au adus date noi şi interesante în legătură cu compoziţia proteică a diferitelor părţi ale sistemului nervos [2], [26], [38—41]. Astfel, proteinele solubile ale substanţelor cenuşie şi albă ale creierului, cerebelului, bulbului şi măduvei diferă prin raporturile cantitative ale fracţiunilor principale, prin existenţa unor fracţiuni suplimentare şi conţin mai ales fracţiuni de tip globulinic, o mică cantitate migrînd în cîmpul electric cu viteza albuminei serice; electroforeza proteinelor din diferite părţi ale creierului a demonstrat că aceste proteine nu sînt distribuite omogen în creier, ci după o anumită arhitectură chimică [42]. În contrast cu proteinele creierului, proteinele nervilor periferici se deosebesc esenţial: acestea conţin în mare cantitate o fracţiune cu mobilitate electrică analogă albuminei serice [3], [43]:

— cercetări electroforetice (deşi foarte puţine) au evidenţiat şi unele modificări ale proteinelor cerebrale în cazul unor afecţiuni ale creierului. Astfel, s-au semnalat modificări la nivelul anumitor fracţiuni electroforetice în cazul existenţei tumorilor cerebrale. Karker şi colab. [28], prin electroforeză în gel de agar, notează modificări în spectrul electroforetic, respectiv o creştere a *gamma*-globulinelor atît la proteinele cerebrale solubile, cît şi la lichidul cefalorahidian în cazuri de scleroză a creierului. S-a semnalat de asemenea [26] pe cale electroforetică o creştere a fracţiunii corespunzătoare a albuminei serice în epilepsie sau stări convulsivante. Cercetări similare au arătat că, la creierul cu edeme simple, spectrul electroforetic al proteinelor solubile nu indică modificări; în cazul edemelor complexe însă, apar fracţiuni

anormale datorită denaturării proteinelor, constatîndu-se o creştere a fracţiunilor corespunzătoare *alfa*-globulinelor şi albuminei ;

— cercetări imunochimice recente au dovedit că majoritatea tipurilor de proteine cerebrale prezintă o individualitate imunochimică definită, nelegată de proteinele serice [44]. În general, prin seruri anticreier pot fi demonstrate nouă antigene ; aceste antigene sînt prezente în toate regiunile din creier [45] ;

— în fine, aplicarea electroforezei la cercetarea proteinelor cerebrale a oferit posibilitatea combinării şi corelării acestei metode cu cea de fracţionare chimică a proteinelor cerebrale prin salifiere ; astfel de cercetări, efectuate practic concomitent de Ghatagnon şi Ghatagnon [46] şi de M. Şerban [6—8], au permis un studiu mai aprofundat al proteinelor solubile din creier, pe baza corelării proprietăţilor de solubilitate salină şi sarcină electrică, aducîndu-se date noi în acest domeniu.

În concluzie, în lumina datelor prezentate şi a consideraţiilor critice enunţate, putem consemna că cercetările electroforetice întreprinse în ultimii ani reprezintă incontestabil o importantă treaptă în procesul de cunoaştere a proteinelor cerebrale. Deşi rezultatele obţinute pînă în prezent de diferiţii autori nu sînt totdeauna concordante, aplicarea metodei electroforetice a adus totuşi contribuţii valoroase la cunoaşterea mai aprofundată a proteinelor cerebrale, ca eterogenitate, natură, proprietăţi.

II. A.1. *Lipoproteide cerebrale.* Lipoproteidele, spre deosebire de proteolipide, sînt combinaţii complexe, solubile în medii apoase. Deşi aceste lipoproteide prezintă o mare importanţă biologică, datele existente pînă în prezent asupra naturii lor chimice şi asupra proprietăţilor lor sînt total insuficiente. După cum a arătat Schmidt [47], se pare că lipoproteidele sistemului nervos ar juca un anumit rol în ultrastructura acestui sistem, în special a tecii de mielină. În 1948, Folch şi Uzman [48] izolează din creier şi descriu o liponucleoproteidă ; componenta lipidică a acestei substanţe reprezintă un amestec de fosfolipide şi glicolipide, iar componenta acvofilă posedă caracteristicile unei nucleoproteide. Liponucleoproteida izolată de autorii citaţi este birefringentă şi, la difracţie cu raze X, prezintă o structură cristalină. O metodă pentru obţinerea lipoproteinelor cerebrale a fost descrisă în 1955 de către Eperjessy şi colab. [49], [50], care au arătat că lipoproteida obţinută de ei este similară fracţiunii Ag a lui Macheboeuf (citat după [51]), dar diferă de lipoproteidele din ficat şi splină. Desoebiri semnificative apar în conţinutul de colesterol al lipoproteidelor, şi anume : creier 9,28%, fracţiunea Ag serică 11,3%, ficat 1,98%, splină 2,2%. Toate aceste lipoproteide se comportă similar la căldură şi la adăugare de săruri sau de acetonă. Autorii citaţi presupun că lipoproteidele cerebrale ar interveni în procesele de oxidare biologică a lipidelor. Bulankin [52] subliniază că în cursul dezvoltării organismului se petrec schimbări la nivelul liponucleoproteidelor din creier, şi anume ar avea loc o înlocuire a complexelor nucleoproteice prin lipide şi prin complexe lipoproteice, datorită scăderii procesului de sinteză a proteinelor.

Unele cercetări electroforetice [18], [25], [27] au arătat că lipoproteidele cerebrale sînt, în general, omogene, situîndu-se ca mobilitate electrică în regiunea *beta*-globulinelor. Recent, M. Şerban [6—7], urmărind fracţionarea chimică prin săruri a proteinelor cerebrale solubile, semnalează solubilitatea redusă a lipoproteidelor din creier, precum şi caracterul lor mai omogen în comparaţie cu proteinele şi glicoproteidele respective.

II. A.2. *Nucleoproteide cerebrale.* Cercetări mai vechi au indicat existenţa nucleoproteidelor în extractele saline ale homogenatelor de creier. Astfel, Halliburton [4] a izolat din creier o nucleoproteidă al cărei acid nucleic, studiat de Levène, nu se deosebeşte esenţial de acizii nucleici ai celorlalte ţesuturi, iar Block [4], extrăgînd ţesutul cerebral cu glicerină şi apoi precipitîndu-l cu acetonă, a obţinut, pe lîngă proteina solubilă în apă, şi o nucleoproteidă. În 1947, Mirsky şi Pollister [53] au izolat din nucleele creierului io substanţă complexă — cromozina —, care conţine trei componenţi : acid dezoxiribonucleic, o histonă, şi o proteină nehistonică. S-au descris două tipuri de acizi nucleici, şi anume : *a*) acizi ribonucleici, care conţin

bazele adenină, guanină, citozină şi uracil, şi *b*) acizi dezoxiribonucleici, care conţin bazele adenină, guanină, citozină, timină şi mici cantităţi de metil-citozină. Cercetări histochimice, folosind ribonuclează, au arătat că citoplasma celulelor nervoase conţine în special acid ribonucleic [1]; în nuclee predomină în schimb acizii dezoxiribonucleici, conform datelor obţinute prin folosirea dezoxiribonucleazei. Acizii nucleici au fost localizaţi de către Hyden [86] în celulele nervoase, pe baza proprietăţii de absorbţie în ultraviolet. Menţinerea unei anumite concentraţii de nucleoproteide în citoplasma celulelor nervoase sau regenerarea rapidă a acestor nucleoproteide după depliere par a fi necesare funcţiei nervoase. Palladin şi colab. [54] au separat o ribonucleoproteidă din creier, descriind unele proprietăţi ale ei. Proteina solubilă în apă reprezintă 20% din acest complex, este precipitabilă cu acizii tricloracetic şi sulfosalicilic şi are punctul izoelectric la pH 4,3—4,4; aceasta este de fapt o lipoproteidă, dat fiind conţinutul ei în lipide (fosfatide, cerebrozide, colesterol).

Lucrări ulterioare au demonstrat că substanţa cenuşie a creierului conţine o cantitate mai mare de nucleoproteide cu acizi ribonucleici decît substanţa albă, mai bogată în dezoxiribonucleoproteide, şi că extractele proteice din creier conţin cantităţi aproximativ egale de acizi ribo- şi dezoxiribonucleici. În 1957, Shenk şi colab. [55] au utilizat electroforeza pentru a examina nucleoproteidele cerebrale izolate prin metodele descrise anterior. Concluzia autorilor este că toate fracţiunile nucleoproteidice obţinute de diferiţii autori sînt neomogene şi că acizii nucleici, lipoproteidele şi proteinele pot fi separate în diferite componente.

II. A.3. *Fosfoproteide cerebrale.* Existenţa unor compuşi proteici cu fosfor a fost semnalată încă de la primele investigaţii efectuate asupra proteinelor solubile din creier. Totuşi, datele cu privire la izolarea şi descrierea proprietăţilor fosfoproteidelor cerebrale lipsesc practic total. Cunoştinţele actuale despre aceste componente se datoresc în exclusivitate datelor furnizate în ultimii ani de cercetările efectuate cu radioizotopi privind încorporarea fosforului radioactiv în anumite fracţiuni proteice din creier. Întrucît aceste date se referă la procesele metabolice, ele vor fi expuse în capitolul respectiv (III).

II. B. PROTEINE CEREBRALE INSOLUBILE

II. B.1 *Proteolipide.* Un nou concept a fost introdus în biochimia creierului prin descoperirea, în 1951, a proteolipidelor, de către Folch şi Lees [56].

Lipidele sistemului nervos pot apărea ca constituenţi ai lipoproteidelor (complexe care se comportă ca proteine) sau ai proteolipidelor (complexe care se comportă ca lipide). Aşadar, proteolipidele sînt biocomponente, complexe proteidolipidice insolubile în apă, însă uşor solubile în amestecuri de cloroform-metanol-apă. Spre deosebire de lipoproteide, care sînt solubile în apă sau soluţii diluate de săruri, proteolipidele manifestă proprietăţile unei lipide la care este ataşată o proteină.

Folch şi Less au izolat din substanţa albă a creierului trei fracţiuni proteolipidice. Proteolipida A este un amestec de proteolipide şi lipide libere, care pot fi izolate fără alterarea proteolipidei A; componenta proteică conţine 1,76% sulf şi este tripsin-rezistentă. Proteolipida B se obţine ca o pulbere microcristalină, compoziţia ei variind cu metoda de izolare; conţine aproximativ 50% proteină, 20% cerebrozide şi 30% fosfatide. Proteolipida C este o pulbere albă, birefringentă, care conţine 75% proteină şi 25% lipide, cu deosebire fosfatide; proteina conţine 1,76% sulf şi este tripsin-rezistentă. În fiecare din aceste trei proteolipide, componentele proteice conţin un procent similar de azot şi sulf, ceea ce sugerează posibilitatea ca aceste proteolipide să conţină aceeaşi proteină.

Chatagnon şi Zolta [57] izolează, după procedeul lui Folch şi Lees, proteolipide din creierul uman şi de bou, dovedind în ambele cazuri compoziţia aproximativ identică în aminoacizi a hidrolizatelor componentelor proteice. Mai recent [58], [59] s-au studiat peptidele şi pro-

teinele asociate cu lipide în proteolipide. A fost izolată o fracțiune proteică numită „neurosclerină", căreia i s-a determinat compoziția în aminoacizi și al cărei conținut crește în dependență de procesul mielinizării; peptidele restante nu prezintă schimbări în legătură cu vîrsta. Date noi asupra proteolipidelor cerebrale au fost aduse de către Folch, Webster și Lees [60], care au indicat o metodă de izolare cantitativă a proteolipidelor, în care aproape toată partea lipidică este combinată cu proteina. Procedeul descris de acești autori implică emulsionarea unui extract lipidic total din substanța albă a creierului și izolarea proteolipidelor ca fracțiune neemulsionabilă după centrifugare.

Natura legăturii dintre componenta lipidică și cea proteică în proteolipide a fost cercetată de Webster și Folch [61]. Influența pH-ului și a forței ionice asupra legăturii proteină-lipidă sugerează că cele două componente sînt unite prin legătură de tip salin. Instabilitatea acestei legături în prezența soluțiilor apoase de săruri a fost observată și de către Uzman [62], la izolarea „neurosclerinei".

Din creier a fost obținut și un alt tip de complex lipidopeptidic, fosfatido-peptidele [3], [63], constituit din fosfoinozitide și peptide cu lanț scurt de aminoacizi. Fosforul componentei fosfatidice prezintă o mare labilitate față de acizii diluați.

II. C. PROTEINE REZIDUALE INSOLUBILE

II. C.1. *Neurocheratine.* Neurocheratina, denumire generică, reprezintă proteine care rămîn după extracții succesive ale țesutului cerebral cu solvenți organici, acizi sau alcalii diluate și după tratarea acestui țesut cu enzime proteolitice. Existența ei a fost semnalată o dată cu primele investigații asupra proteinelor din creier atît pe cale chimică, cît și histologică. Astfel, Ewald și Kühne [64], care au izolat-o prima dată, compară această proteină, după solubilitatea și rezistența ei, cu proteinele țesutului cornos; ei au arătat că raportul dintre conținutul de tirozină și leucină este similar celui din cheratina țesutului cornos. În 1890, Kühne și Chittenden [1] determină compoziția elementară a neurocheratinei, stabilind că substanța albă a creierului conține aproximativ de patru ori mai multă neurocheratină decît substanța cenușie. Palladin [11] a dovedit că substanța cenușie și cea albă a creierului se diferențiază evident și prin conținutul lor în proteine insolubile; acestea reprezintă 5—7% din azotul total proteic al substanței cenușii și 20—22% din azotul total proteic al substanței albe.

Izolarea și evidențierea proteolipidelor din țesutul cerebral de către Folch și Lees au determinat o revizuire a concepției clasice asupra neurocheratinei ca entitate chimică. Astfel, autorii citați consideră că neurocheratina poate reprezenta, în parte, componenta proteică a proteolipidelor. Le Baron și Folch [65] au descris, de asemenea, un complex lipidoproteic rezistent la acțiunea tripsinei, complex ce rămîne în substanța albă a creierului după îndepărtarea componenților acidosolubili, a lipidelor și proteolipidelor. Această substanță, care poate fi considerată ca o parte a neurocheratinei clasice, conține inozitol-difosfat în formă combinată, similară sau identică cu difosfoinozitidele din creier. Pe de altă parte, s-a arătat că prezența fosforului în materialul rămas după extracția părții acvosolubile și a lipidelor s-ar datora existenței în aceste reziduuri a fosfatidopeptidelor.

Rezultă așadar că neurocheratina clasică reprezintă, cel puțin parțial, un amestec de produși de degradare ai proteolipidelor sau ai altor complexe lipidoproteice.

III. BIOCHIMIA DINAMICĂ A PROTEINELOR CEREBRALE

Autoreînnoirea proteinelor cerebrale. În partea introductivă am subliniat că proteinele cerebrale au fost considerate pînă nu de mult inerte din punctul de vedere al participării lor la procesele biochimice și fiziologice legate de activitatea nervoasă. Cercetările cu radio-

izotopi efectuate în ultimii ani au permis conturarea unor puncte de vedere noi asupra metabolismului proteinelor cerebrale, ajungîndu-se la concluzii importante, care au determinat o nouă orientare în această direcție.

Primele cercetări (1947—1950) [66] cu radioizotopi asupra metabolismului proteinelor cerebrale au urmărit includerea aminoacizilor marcați în structura acestor proteine. După 1953, o serie de cercetători au relevat activitatea metabolică intensă a proteinelor cerebrale [67—72], prin încorporarea diferiților aminoacizi marcați în aceste proteine, respectiv prin stabilirea vitezei lor de reînnoire. Aceste cercetări au scos în evidență și faptul că semiviața proteinelor cerebrale reflectă viteza diferită a metabolismului diverselor tipuri de proteine cerebrale care formează o așa-zisă topografie chimică. Această constatare a fost confirmată, proteinele cele mai active din punct de vedere metabolic dovedindu-se a fi cele extrase cu apă sau cu clorură de sodiu, iar cele mai puțin active fiind proteinele reziduale, care rămîn în precipitat după extracție cu alcalii. Comparativ cu proteinele creierului, cele ale nervilor periferici posedă un metabolism mult mai scăzut.

Pentru a corela activitatea metabolică a diferitelor fracțiuni proteice cu structura anatomică a creierului, a fost urmărită viteza de reînnoire a proteinelor ce aparțin diverselor arii ale sistemului nervos central. În acest sens s-a constatat că proteinele diferitelor părți ale creierului se metabolizează cu o viteză variată. Astfel, radiometionina [73], [74] se include mai rapid în proteinele substanței cenușii a emisferelor cerebrale și a cerebelului, pe cînd substanța albă a emisferelor și măduva au o activitate mult mai scăzută; o poziție intermediară ocupă bulbul, talamusul și hipotalamusul. Așadar, proteinele emisferelor, ale scoarței și ale substanței cenușii posedă un metabolism mai crescut comparativ cu proteinele dispuse mai profund [75], în formațiile filogenetice mai vechi.

Aplicarea radioizotopilor a permis să se dovedească și să se urmărească starea dinamică a proteinelor cerebrale și la nivelul diferitelor structuri intracelulare obținute prin centrifugare diferențială. Cercetările efectuate în această direcție [76—78] au demonstrat că radioactivitatea specifică cea mai înaltă, respectiv gradul de metabolizare cel mai activ, o prezintă fracțiunile proteice localizate în ribozomi și în microzomi. În raport cu acestea, proteinele din mitocondrii prezintă cea mai mică includere de aminoacizi marcați, respectiv cea mai mică viteză de reînnoire. Proteinele nucleului celular se situează din acest punct de vedere pe o poziție intermediară. Activitatea metabolică deosebită a proteinelor fracțiunii microzomiale se atribuie existenței unui complex liponucleoproteic, care a fost extras din microzomi.

Determinări comparative făcute asupra proteinelor nucleare și citoplasmatice [79] din creier și cerebel au stabilit deosebirea de comportare a acestor proteine față de viteza de încorporare a radiometioninei, arătînd că această viteză este mult mai mare în cazul proteinelor nucleului. Deosebirea dintre reînnoirea proteinelor citoplasmatice și a proteinelor nucleului reflectă atît compoziția diferită a acestor proteine, cît și particularitățile funcționale ale acestor infrastructuri.

Starea dinamică a proteinelor cerebrale a fost relevată și de o serie de alte cercetări, care au confirmat metabolizarea acestor proteine în cursul dezvoltării ontogenetice a creierului sau în diferite stări funcționale ale acestuia.

Prin cercetarea vitezei de includere a aminoacizilor marcați (glicocol, metionină, lizină, leucină) și a vitezei de reînnoire a proteinelor din creier în diferite etape ale dezvoltării ontogenetice, s-a conchis [68], [80], [81] că gradul de metabolizare a acestor proteine este mai ridicat la animalele tinere și se micșorează cu vîrsta. Schimbarea metabolismului proteinelor din creier o dată cu vîrsta este dependentă de apariția unor noi tipuri de proteine, de o mărire a gradului de eterogenitate sau de o mărire a conținutului de proteine specifice țesutului nervos la animalele adulte.

Alte cercetări au fost consacrate stabilirii unor corelații între diferitele stări funcționale ale sistemului nervos central și variațiile metabolismului proteinelor din creier. S-a constatat

astfel că în stările de excitație ale sistemului nervos central, apropiate de cele fiziologice, se produce o creștere a metabolismului proteinelor cerebrale [80]. Reversul a fost observat în cazul utilizării unor excitanți puternici sau cu acțiune prelungită, care pot provoca fie o stare de supraexcitare, fie una de epuizare a sistemului nervos.

Cercetări efectuate cu fosfor radioactiv au demonstrat că fosfoproteidele cerebrale sînt implicate, de asemenea, în procese metabolice active. Fosfoproteidele cerebrale prezintă o activitate specifică mare [82], [83], în special după excitarea țesutului cerebral [84]. Intensitatea metabolică maximă a fosfoproteidelor a fost găsită în fracțiunea nucleară, și nu în mitocondrii sau microzomi. Această intensitate crescută după stimulare indică — după părerea lui Vladimirov [85] — participarea fosfoproteidelor la procesul de transmitere a stimulilor în sistemul nervos. Același autor a izolat din creier o fosfolipoproteidă al cărei fosfor prezintă o viteză de încorporare mare, care variază în dependență de starea funcțională a sistemului nervos central. Încorporarea ^{32} P în fracțiunea fosfoproteică din creier este mai rapidă decît în cazul acizilor nucleici.

Unele aspecte ale corelației dintre metabolismul proteinelor cerebrale și diferite stări funcționale ale creierului au fost evidențiate și pe alte căi decît aceea a cercetării cu radioizotopi. Menționăm astfel că Hyden și Pigon [86], prin spectrofotometrie în ultraviolet, au constatat o creștere a conținutului proteic după o excitație slabă și o scădere în cazul unei excitații puternice. Autorii au conchis că metabolismul proteinelor din celula nervoasă se intensifică în urma excitațiilor fiziologice în care predomină procesele anabolice. Activitatea funcțională a țesutului cerebral reprezintă un proces biochimic ciclic de degradare și de resinteză a proteinelor cerebrale.

Metabolismul acestora în diferite stări funcționale a fost semnalat și prin evidențierea unor modificări la nivelul grupărilor sulfhidrilice. Astfel, Ungar și Romano [87] au constatat în excitație și „repaus" o creștere, respectiv o revenire la valoarea normală a grupărilor sulfhidrilice. Aceste schimbări reversibile sînt considerate de către autori ca o indicație a reorganizării structurale a unor proteine care pot participa la procesul excitației. Creșterea conținutului grupărilor sulfhidrilice în țesutul cerebral a fost semnalată și în starea narcotică, iar Bureș și Koștoiant [88] subliniază rolul pe care grupările sulfhidrilice l-ar avea în propagarea depresiunii activității bioelectrice a cortextului cerebral.

În concluzie la acest capitol, se impune sublinierea faptului că proteinele cerebrale sînt componente biochimice active, implicate în procese metabolice legate de activitatea funcțională a sistemului nervos central. Actualmente însă nu putem preciza în suficientă măsură rolul specific al acestor proteine și legătura cauzală dintre ele și funcțiile țesutului cerebral.

IV. BIOCHIMIA COMPARATĂ A PROTEINELOR DIN CREIER

Cele cîteva date de biochimie comparată, existente disparat, cu privire la proteinele din creier și pe care le sintetizăm în acest subcapitol, se referă îndeosebi la evoluția ontogenetică.

S-a semnalat astfel că segmentele cele mai complexe ale sistemului nervos conțin o cantitate mai mare de substanțe proteice [89]; concentrația acestora variază cu dezvoltarea ontogenetică, fiind crescută în fazele embrionară și postnatală, în comparație cu creierul organismului adult. Deși unele rezultate sînt contradictorii, se admite că există o tendință de creștere a conținutului proteinelor cerebrale atît în substanța cenușie, cît și în cea albă în timpul primului an de viață. Conținutul proteic al diferitelor regiuni descrește în ordinea următoare: măduvă, hipotalamus, cerebel, creier mijlociu, cortex, la animalele mai tinere, de pînă la 40 de zile; la cele bătrîne, secvența este inversă. Aceste date confirmă unele rezultate mai vechi, care au arătat că conținutul în azot total crește în acele părți ale sistemului nervos care sînt mai tinere din punct de vedere filogenetic. Concentrația fosfoproteidelor este

mai mare în cerebel, mai mică în substanţa cenuşie şi foarte mică în substanţa albă a emisferelor cerebrale. Din embrionul de creier uman a fost izolată o proteină omogenă asociată cu o mică cantitate de lipide şi care conţine acid dezoxiribonucleic ; un component proteic cu aceeaşi constantă de sedimentare a fost obţinut şi din embrionul de creier de la iepure şi găină, compoziţia în ultimul caz fiind însă diferită. În creierul organismului adult s-au obţinut diagrame de sedimentare difuze, indicînd o mare eterogenitate în dimensiunea particulelor.

Uzman [90] a urmărit peptidele şi proteinele lipofile din creier în funcţie de dezvoltarea organismului. Autorul a constatat că unele proprietăţi ale lor, precum şi compoziţia în aminoacizi, variază cu vîrsta. Fracţiunea proteică lipofilă, denumită neurosclerină, este o componentă specifică al cărei conţinut în creier creşte pînă la maturare, dar care păstrează o compoziţie constantă în aminoacizi. Pe de altă parte, s-a constatat că proteolipidele sînt virtual absente în primele zile de viaţă, dar cantitatea lor creşte ulterior, în mod evident, o dată cu procesul de mielinizare.

Se constată, în general, că cercetările de biochimie comparată a proteinelor din creier sînt încă extrem de puţin dezvoltate şi că, mai ales din punct de vedere filogenetic, cercetări sistematice referitoare la aceste proteine au lipsit practic total pînă în ultimii ani.

Începînd din anul 1959, problema biochimiei comparate a proteinelor cerebrale solubile, în dependenţă de evoluţia filogenetică a creierului, a fost abordată de către noi în cadrul unei serii de cercetări [5—10]. Generalizarea materialului experimental obţinut ne-a permis să stabilim legătura generală şi unele trăsături caracteristice ale acestor proteine în filogenia creierului ; cercetări efectuate prin variate procedee experimentale au conturat ideea fundamentală că proteinele cerebrale solubile prezintă atît o diferenţiere calitativă, o diversitate de tipuri de proteine, cît şi o unitate. Dacă diversitatea, manifestată prin grade de eterogenitate diferite ale proteinelor cerebrale, reflectă evoluţia creierului pe plan filogenetic, unitatea este determinată de natura comună, de existenţa unui fond comun al proteinelor cerebrale în filogenie, exprimat prin identitatea unui ansamblu de proprietăţi ale acestor proteine. Generalizarea rezultatelor noastre subliniază faptul că în cercetarea „istorică" a proceselor biochimice punerea în evidenţă a trăsăturilor comune în cadrul diversităţii poate avea o importantă semnificaţie, mai ales cînd există manifestări funcţionale complexe, ca rezultat al evoluţiei.

Considerăm că datele noastre referitoare la biochimia comparată a proteinelor cerebrale — date care vor face obiectul unei viitoare lucrări — reprezintă totodată un anumit aport adus la conturarea unui capitol important al biochimiei comparate [91], [92]. Aceste ramuri noi şi de perspectivă a biochimiei generale i se acordă astăzi un interes crescînd, pe măsura progreselor care caracterizează actuala etapă de dezvoltare a biochimiei.

Prezentat la redacţie la 11 aprilie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Elliot K. A. C., Page I. H., Quastel I. H., *Neurochemistry*, Springfield, Illinois 1954.
2. Palladin A. V., în *Metabolism of the Nervous System*, Pergamon Press, 1960, p. 456.
3. Le Baron F. N., Ann. Biochem., **28**, 583 (1959).
4. Şerban M., Teză de doctorat, Bucureşti, 1963, 236 p.
5. Şerban M., St. cerc. biochim., **2**, 309 (1959).
6. Şerban M., St. cerc. biochim., **4**, 103 (1961).
7. Şerban M., *Studies of the brain water-soluble proteins in phylogeny*, V-th Int. Cong. Biochem., **6**, 150 (1961).

8. Şerban M., St. cerc. biochim., **6**, 383 (1963).
9. Şerban M., Rev. roum. Biochim., **1**, 217 (1964).
10. Şerban M., Rev. roum. Biochim., **1**, 335(1964).
11. Palladin A. V., Fiziol. J. SSSR, **33**, 727 (1947).
12. Poliakova N. M., Gotovţeva O. P., Ukrain. Biochim. Jurn. **29**, 400 (1957).
13. Le Baron F. N., Folch-Pi J., J. Neurochem. **4**, 1 (1959).
14. Porter H., Folch J., J. Neurochem., **1**, 260 (1957).
15. Thompson R. H., Webster G. R., Ann. Biochem., **29**, 365 (1960).
16. Demling L., Kinzelmeyer H., Henning N., Z. ges. exp. Med., **122**, 416 (1954).
17. Palladin A. V., Poliakova N. M., Dokl. Akad. Nauk SSSR, **107**, 568 (1956).
18. Hofmann G., Schinko H., Klin. Wschr., **34**, 86 (1956).
19. Keup W., Confin. neurol., **15**, 73 (1955).
20. Caravaglios R., Cheaverni P., Experientia, **12**, 303 (1956).
21. Tonini G., Missere G., Boll. Soc. ital. Biol. sper., **33**, 1 169 (1957).
22. Inessi G., Dessi P., Boll. Soc. ital. Biol. sper., **33**, 7 (1958).
23. Gent W. L. Biochem, J., **73**, 6 P (1959).
24. Webster R., Nature, **180**, 660 (1957).
25. Robertson D., J. Neurochem., **1**, 358 (1957).
26. Kazutami Kiyota, J. Neurochem., **4**, 202 (1959).
27. Chatagnon P., Chatagnon C., Ann. Biol. Clin., **3—4**, 140 (1960).
28. Karker D., van Sande M., Lowenthal A., J. Neurochem., **4**, 135 (1959).
29. Poliakova N. M., Lişko V. K., Ukrain. Biochim. J., **34**, 10 (1962).
30. Bailey B. S., Heald P. J., J. Neurochem., **7**, 81 (1961).
31. Mould D. L., Dawson A., Biochem. J., **84**, 52 P (1962).
32. Bondy S. C., Perry S. V., J. Neurochem., **10**, 593 (1963).
33. Bogoch S., Rajam P., Belval B., Nature, **204**, 73 (1964).
34. Pun J., Lobrozo L., Annal. Biochem., **9**, 9 (1964).
35. Vos J., van der Helm H. J., J. Neurochem., **11**, 208 (1964).
36. Moore B., Gregor D. Mc. J. biol. Chem., **240** 1 047 (1965).
37. Monsen G., Cumings J., J. Neurol., Neurosurg., Psychiat., **28**, 56 (1965).
38. Poliakova N. M., Ukrain. Biochim. J., **28**, 284 (1956).
39. Poliakova N. M., Dokl. Akad. Nauk SSSR, **1**, 174 (1956).
40. Palladin A. V., *Vopr. Biochim. Nervnoi Sistemu*, Sbornik, 1957, p. 9.
41. Karker D., Lowenthal A., van Sande M., Clin. chim. Acta, **3**, 76 (1958).
42. Depieds R., Cartouzou G., Gignoux D., Colen M., C. R. Soc. Biol., **155**, 316 (1961).
43. Palladin A. V., Poliakova N. M., IV-th Int. Cong. Biochem.. **15** (1958).
44. Depieds R., Cartouzou G., Gignoux D., C. R. Soc. Biol., **155**, 1 966 (1961).
45. Scholekam M., *Protides Biol. Fluids, Proc. 9-th Collq.*, Chem. Abstr., **57**, 9 039 b(1962).
46. Chatagnon C., Chatagnon P., Ann. Biol. clin., **3—4**, 156 (1960).
47. Schmidt F. O., Advanc. Protein Chem., **1**, 25 (1944).
48. Folch J., Uzman L., Fed. Proc., **7**, 155 (1948).
49. Eperjessy A., Kiss A., Csegedy I., Mokkai I., Nemes L., Orvosi Szemle, **1**, 59(1955).
50. Eperjessy A., Kiss A., Csegedi I., Mokkai I., Nemes L., Orvosi Szemle, **2**, 22 (1956).
51. Polonovsky J., Exp. Ann. Biochim. Med., **19**, 59 (1957).
52. Bulankin I., Rev. J. Biol. Him., 1423 (1955).
53. Mirsky A. E., Pollister A. W., J. gen. Physiol., **30**, 117 (1947).
54. Palladin A. V., Stutman T. M., Raşba E. I., Ukrain. Biochim. Jurn., **23**, 176 (1951).
55. Pei-Ken Shenk, Tsai-Ping Li, Tien-Chin Tsad, Sci. Sinica, **6**, 309 (1957).
56. Folch-Pi J., Lees M., J. biol. Chem., **191**, 807 (1951).
57. Chatagnon C., Zolta J., Bull. Soc. Chim. Biol., **35**, 419 (1953).
58. Uzman L., Rosen H., Arch. Biochem. Biophys., **76**, 490 (1958).
59. Matsumato M., Matsumato R., Folch-Pi J., J. Neurochem., **11**, 829 (1964).
60. Folch-pi J., Webster G., Lees M., Fed. Proc., **18**, 218 (1959).
61. Webster G., Folch-Pi J., Ann. Rev. Biochem., **29**, 367 (1960).
62. Uzman L., Arch. Biochem. Biophys., **76**, 474 (1958).
63. Le Baron F. N., Rothleder E., Abstr. Int. Cong. Biochem., 4-th, Wien, **206** (1958).
64. Ewald A., Kühne W., Ann. Biochem., **28**, 583 (1959).
65. Le Baron F. N., Folch-pi J., J. Neurochem., **1**, 101 (1956).
66. Palladin A. V., St. cerc. biochim., **6**, 1(1963).
67. Gaitonde M. K., Richter D., Biochem. J., **55**, VIII (1953).
68. Gaitonde M. K., Richter D., Biochem. J., **59**, 690 (1955).
69. Gaitonde M. K., Richter D., în *Metabolism of the Nervous System*, Pergamon Press, 1957, nr. 449.

70. Vladimirov G. E., Urinson A. P., Biohimia, **22**, 709 (1957).
71. Waelsch H., în *Metabolism of Nervous System*, Pergamon Press, 1957, p. 431.
72. A. Lajtha, J. Neurochem., **3**, 358 (1959).
73. Palladin A. V., Wertheimer N., Dokl. Akad. Nauk SSSR, **102**, 319 (1955).
74. Wertheimer N., *Studiul intensităţii refacerii proteinelor în sistemul nervos central cu ajutorul sulfului radioactiv*, Bucureşti, Edit. Acad. R.P.R., 1957.
75. Furst S., Lajtha A., Waelsch H., J. Neurochem., **2**, 216 (1958)
76. Palladin A. V., Belik I., Kraciko L., Dokl. Akad. Nauk SSSR, **127**, 702 (1959).
77. Clouet D., Richter D., Biochem. J., **65**, 20 P (1957).
78. Clouet D., Richter D., J. Neurochem., **3**, 219 (1959).
79. Belik I., Kraciko L., Ukrain. Biochim. J., **31**, 322 (1959).
80. Palladin A. V., Belik I., Kraciko L., Biohimia, **22**, 359 (1957).
81. Clouet D., Gaitonde M. K., J. Neurochem., **1**, 126 (1956).
82. Engelhardt V. A., Lisovskaia N. P., Biohimia, **20**, 225 (1955).
83. Vladimirov G. E., Ivanova T. N., Pravdina N. I., Biohimia, **21**, 155 (1956).
84. Heald P. J., Biochem. J., **73**, 132 (1959).
85. Vladimirov G. E., Fiziol. J. SSSR, **39**, 3 (1953).
86. Hyden H., Pigon A., J. Neurochem., **6**, 57 (1960).
87. Ungar G., Romano D., Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., **97**, 324 (1958).
88. Bureş I., Koştoianţ K. S., Dokl. Akad. Nauk SSSR, **1**, 118 (1955).
89. Palladin A. V., Priroda, **8**, 15 (1954).
90. Uzman L., Arch. Biochem. Biophys., **76**, 474 (1958).
91. M. Florkin, *Comparative Biochemistry*, New York-London, Acad. Press. 1960.
92. Anfinsen C. B., *The Molecular Basis of Evolution*, J. Wiley, 1960.

Dünnschicht-Chromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie (Cromatografia în strat subţire în chimia aminoacizilor şi peptidelor), G. PATAKI, Edit. Walter de Gruyter et Co., Berlin, 1966, XX+250 p.

Dezvoltarea şi perfecţionarea din ce în ce mai rapidă a tehnicilor cromatografice moderne au adus contribuţii însemnate chimiei şi biochimiei aminoacizilor, peptidelor şi proteinelor, mai ales în ceea ce priveşte aprofundarea aspectelor structurale ale acestora.

Cromatografia în strat subţire, introdusă de E. Stahl ca metodă de laborator, indispensabilă în domeniul substanţelor lipofile, a fost folosită în ultimii ani în măsură din ce în ce mai mare şi la analiza aminoacizilor, peptidelor şi derivaţilor lor, ceea ce a avut ca urmare creşterea exponenţială a numărului de publicaţii care se ocupă de această problemă (de la 1—2 lucrări între 1958 şi 1959 la peste 60 în 1964).

Apariţia cărţii lui G. Pataki aduce deci o contribuţie însemnată la umplerea unui gol într-un domeniu care se dezvoltă într-un ritm deosebit de rapid.

Neputînd cuprinde toate domeniile aplicabilităţii cromatografiei în strat subţire, autorul[1] îşi propune să prezinte într-o lucrare monografică anumite aspecte, tratate mai pe larg, şi anume, pe de o parte, problemele generale ale cromatografiei în strat subţire, şi pe de altă parte folosirea acestei metode în domeniul chimiei aminoacizilor şi peptidelor.

Cartea se împarte în patru părţi, care se ocupă de următoarele probleme :

I. Tehnica cromatografiei în strat subţire.

II. Cromatografia în strat subţire a aminoacizilor, peptidelor şi combinaţiilor înrudite.

III. Aplicarea cromatografiei în strat subţire la analiza secvenţei proteinelor şi peptidelor.

IV. Aminoacizii şi combinaţiile înrudite din materialul biologic.

Fiecare parte este împărţită în mai multe capitole.

În prima parte, tehnica cromatografiei în strat subţire este expusă atît de amănunţit, încît cititorul poate executa şi evalua cu uşurinţă cromatogramele, fără a fi necesar să studieze în prealabil literatura originală sau alte tratate de specialitate.

Un capitol al primei părţi se ocupă de problema obţinerii stratului subţire, indicînd diferite tipuri de întinzătoare, instalaţii simple necesare obţinerii unei întinderi convenabile a stratului de gel, precum şi pregătirea manuală a stratului.

Capitolul al doilea tratează pe larg desfăşurarea analizei cromatografice. Pe lîngă tehnica de aplicare a probelor, el include şi diferite tipuri de developări (ascendentă, orizontală, multiplă, de curgere, multidimensională). Capitolul mai cuprinde de asemenea cromatografia în strat subţire polizonală, tehnica folosirii gradientului, cromatografia în strat subţire preparativă, electroforeza în strat subţire şi radiocromatografia. În final se dau prescripţii de lucru pentru executarea cromatogramelor în strat subţire.

Ultimul capitol este consacrat interpretării cromatogramelor. Referitor la valorile R_F în cromatografia în strat subţire, sînt arătaţi factorii care influenţează reproductibilitatea valorilor R_F, se trag concluzii pentru practică şi se face o comparaţie cu valorile obţinute în cromatografia pe hîrtie. Tot aici este tratată problema valorilor R_F legată de structura chimică, cu

discutarea relației Martin și a aplicării sale. Capitolul se încheie cu date referitoare la cromatografia în strat subțire cantitativă.

Partea a doua, care tratează amănunțit cromatografia în strat subțire a aminoacizilor, peptidelor și combinațiilor înrudite, dă indicații de lucru exacte pentru fiecare metodă de separare în parte. Este prezentată pe larg folosirea cromatografiei în strat subțire la urmărirea sintezelor chimice ale peptidelor și produșilor intermediari.

Primul capitol cuprinde problemele legate de cromatografia în strat subțire pe diferite tipuri de straturi (Kieselgel, straturi anorganice, straturi de celuloză), cu date asupra pregătirii fiecărui tip de gel în parte, a eluantului, a valorilor R_F și a diferitelor tipuri de separare (bi- și multidimensională). Tot aici este expusă și electrocromatogrfia. Referitor la punerea în evidență a aminoacizilor, sînt date o multitudine de reacții de culoare caracteristice. În acest capitol este inclusă și cromatografia în strat subțire a aminoacizilor cu iod (monoiodtirozina, diiodtirozina, diiodtironina, triiodtironina și tiroxina).

Capitolul al doilea se ocupă de peptide și de produșii intermediari ai sintezei peptidelor. În cadrul acestor preocupări stau cromatografia în strat subțire a peptidelor, controlul sintezei peptidelor și punerea lor în evidență, ca și a derivaților lor, cu ajutorul reacțiilor de culoare.

În partea a treia a monografiei se încadrează descrierea cromatografiei în strat subțire pentru analiza secvenței proteinelor și peptidelor.

Capitolul întîi prezintă pe larg analiza hidrolizatelor totale (acide, alcaline și prin schimbători de ioni) ale proteinelor și peptidelor, cu aplicațiile respective. Tot în acest capitol este inclusă și tehnica „amprentelor" (*fingerprint*) în strat subțire.

Capitolul al doilea tratează problema aminoacizilor N-2,4-dinitrofenil (DNP), și anume dinitrofenilarea aminoacizilor, peptidelor, polipeptidelor și proteinelor (în cazul ultimilor produși se face hidroliza parțială). După efectuarea cromatografiei în strat subțire a aminoacizilor dinitrofenil solubili în apă și a celor solubili în eter, sînt date prescripțiile de lucru și metodele de identificare.

Capitolul al treilea este consacrat aminoacizilor N-*2,4*-dinitro-*5*-aminofenil (DNAP) și *1*-dimetil-aminonaftalin-*5*-sulfonil. Sînt date procedeele de preparare, de determinare a aminoacizilor N-terminali ai unei peptide, indicații care se referă la cromatografiere (eluanți, valori R_F, separarea mono- și bidimensională), precum și metodele de identificare.

Capitolul al patrulea se ocupă de *3*-fenil-*2*-tiohidantoine (PTH). El cuprinde metodele de preparare a aminoacizilor PTH, metodele de scindare a peptidelor și proteinelor, cromatografia aminoacizilor PTH cu tot ce derivă din ea, ca alegerea eluanților, valori R_F, reacții de culoare, de identificare.

Ultimul capitol tratează despre trinitrofenil-aminoalcooli.

Aplicarea exactă a prescripțiilor date în a treia parte a monografiei face posibilă determinarea structurii proteinelor și peptidelor și creează baza de discuție a problemelor legate de analiza secvențelor.

În partea a patra este descrisă analiza aminoacizilor și a combinațiilor înrudite, existente în materialul biologic.

În capitolul întîi sînt incluse date referitoare la cromatografia și electrocromatografia aminoacizilor liberi. Este vorba atît de pregătirile necesare efectuării cromatogramelor (înlăturarea materialelor albuminoide, polizaharide și lipoide, tratarea cu uree, desalifierea etc.), cît și de metodele de separare a aminoacizilor din urină și sînge.

Capitolul al doilea se referă la cromatografia DNP-aminoacizilor, în care sînt date din nou procedeele pregătirilor de cromatografiere (dinitrofenilare; determinarea aminoacizilor din urină, sînge, spermă; extragerea DNP-aminoacizilor solubili în eter sau solubili în apă), ca și cele ale separării DNP-aminoacizilor din urină, sînge, spermă.

Fiecare capitol discută posibilităţile de aplicare ulterioară a acestor procedee, ţinîndu-se seama, între altele, de particularităţile clinice. Indicaţiile precise asupra pregătirii materialului de analiză şi asupra punerii în evidenţă a combinaţiilor biologice mai importante au ca scop uşurarea aplicării cromatografiei în strat subţire în laboratoarele clinice.

Monografia, pe lîngă că va fi pentru cel care o consultă un îndreptar şi un sfătuitor preţios, are meritul de a cuprinde într-un tot un bogat material bibliografic, la zi, în domeniile pe care le tratează.

Cartea, prezentată în condiţii grafice excelente, cuprinde 128 de figuri, 52 de tabele, 463 de trimiteri bibliografice, indice de subiecte şi autori.

Corina Dragomirescu
Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

MALCOLM DIXON şi EDWIN C. WEBB, *Enzymes* (Enzimele), ed. a 2-a, Edit. Longmans, Green a. Co. Ltd., Londra şi Colchester, 1964, 950 p.

Publicarea în 1961 a Dării de seamă a Comisiei pentru enzime a Uniunii internaţionale de biochimie reprezintă un moment important în relativ scurta, dar tumultuoasa dezvoltare a enzimologiei. Clasificarea şi nomenclatura enzimelor şi a coenzimelor, precizarea unităţilor şi a metodelor standard de exprimare a activităţii enzimelor, indicarea simbolurilor propuse de această comisie pentru descrierea cineticii reacţiilor enzimatice au constituit unul din factorii care au contribuit la dezvoltarea enzimologiei în ultimii ani.

Ediţia a doua a monografiei prof. Dixon şi prof. Webb oglindeşte progresele enzimologiei în cei 6 ani trecuţi de la apariţia primei ediţii din 1958. Autorii au prelucrat din nou cele 13 capitole ale cărţii, folosind din vasta literatură publicată între timp peste 500 de lucrări noi, adăugate celor 2 400 de lucrări consultate în ediţia anterioară, şi au alcătuit o lucrare unitară despre principalele probleme ale enzimologiei.

Primele două capitole tratează despre metodica de lucru cu enzimele şi metodele de izolare a acestora. Pe baza definiţiilor Comisiei pentru enzime, sînt precizate noţiuni ca activitatea specifică şi moleculară, activitatea centrului catalitic. Sînt prezentate modul de măsurare a vitezei reacţiilor enzimatice, stabilirea activităţii specifice şi moleculare, metodele cantitative de determinare a reacţiilor enzimatice (spectrofotometrice, manometrice, tehnica Thunberg, cromatografice, polarimetrice, chimice, folosirea electrozilor). Dintre metodele de izolare a enzimelor se remarcă tehnica cromatografiei pe coloane, cum este metoda folosită de Moore şi Lee (1960) pentru separarea concomitentă pe DEAE-celuloză a 6 enzime din ficatul de şobolan. Desigur că în cele 45 de pagini ale acestor două capitole nu sînt date decît indicaţii generale privind metodele de lucru cu enzimele, acestea fiind tratate pe larg în cele 7 volume *Methods in Enzymology* apărute în 1955—1964 sub redacţia lui Colowick şi Kaplan.

Capitolul despre cinetica acţiunii enzimelor (cel mai dezvoltat din întregul volum, cuprinzînd 128 de pagini) este mult schimbat faţă de ediţia anterioară şi tratează despre factorii care influenţează viteza reacţiilor enzimatice : concentraţia enzimei şi a substratului, efectul temperaturii şi al pH-ului. Dintre factorii enumeraţi, concentraţia substratului are o importanţă deosebită pentru determinarea vitezei reacţiilor enzimatice. Sînt analizate cinetica reacţiilor la care participă două substraturi, inhibarea datorită concentraţiilor mari ale substratului,

cazul substraturilor care acționează concomitent și ca activator al enzimelor, cinetica reacțiilor provocate de o enzimă care catalizează concomitent două reacții sau acțiunea concomitentă a două enzime asupra unui singur substrat. Sînt exemplificate diferite metode grafice de determinare a vitezei reacției enzimatice în mediu saturat cu substrat și a constantei Michaelis.

Capitolul al 5-lea, „Clasificarea enzimelor", oglindește rezultatele activității Comisiei pentru enzime, activitate dificilă în încercarea de a pune ordine în clasificarea enzimelor, lucrare la care prof. Dixon și prof. Webb au participat activ. Toate enzimele cunoscute au fost împărțite în 6 clase, fiecare din acestea cuprinzînd subclase și sub-subclase, iar fiecare enzimă individuală purtînd un număr de ordine și o denumire sistematică, pe lîngă cea curentă. Este dată lista a 842 de enzime cunoscute pînă la mijlocul anului 1962, cuprinzînd numărul de ordine al Comisiei pentru enzime, denumirea sistematică și pe cea curentă (216 oxidoreductaze, 221 de transferaze, 206 hidrolaze, 105 liaze, 46 de izomeraze, 45 de ligaze), reacția pe care o catalizează, grupările active și cofactorii acestei enzime, sursa de unde a fost obținută în stare pură, unele însușiri specifice, principalele indicații bibliografice. Lista enzimelor este exemplificată la sfîrșitul volumului cu un atlas conținînd 134 de figuri de enzime obținute în stare cristalină.

Într-un capitol scurt este prezentată activitatea specifică a enzimelor, de natură chimică și stereospecifică. Dintre exemplele activității specifice a diferitelor clase de enzime, menționăm un tabel care sistematizează însușirile specifice ale diferitelor peptidaze asupra a 406 substraturi peptidice. În continuare sînt prezentate mecanismele acțiunii enzimelor. Autorii au renunțat la expunerea diferitelor teorii de interes istoric, în favoarea prezentării rezultatelor cercetărilor din ultimii ani cu privire la mecanismul reacțiilor transferului de hidrogen, mecanismul acțiunii transferazelor și al hidrolazelor. În mod mai sumar sînt prezentate mecanismele acțiunii izomerazelor, ligazelor și metaloenzimelor. Dintre metodele experimentale de cercetare a mecanismului acțiunii enzimelor, autorii se opresc la metoda schimbului izotopic, metoda imersiei optice, studiul concurenței enzimatice.

Capitolul despre inhibitorii enzimelor tratează o problemă care în ultimii ani a căpătat o importanță practică evidentă pentru diferite domenii ale biochimiei, farmacologiei, toxicologiei. Sînt prezentate tipurile de inhibitori competitivi, necompetitivi și micști. Într-un tabel este sistematizată acțiunea inhibitorie a substratelor toxice pentru diferite enzime respiratorii. Sînt examinate acțiunea toxică a metalelor grele, reacțiile ce acționează asupra grupărilor tiolice, inhibitorii ireversibili organofosforici, inhibitorii respirației și ai fosforilării, rolul antienzimelor.

Nu mai puțin importanți în activitatea enzimatică sînt cofactorii enzimatici. Aceștia sînt tratați într-un capitol în care un rol primordial este acordat coenzimelor specifice, cum sînt : NAD, NADP, coenzima I, coenzima II, cozimaza, fosfocozimaza, DPN, TPN. Sînt sintetizate rezultatele cercetărilor privitoare la structura și funcțiunile acidului lipoic, glutationului, acidului ascorbic, chinonelor (ubichinona, vitamina K, menadiona). Un tabel prezintă cei 32 de citocromi cunoscuți, clasificați în patru grupe după natura hemului grupării prostetice. O categorie importantă de cofactori o reprezintă activatorii ; se arată acțiunile specifice ale cationilor anorganici, cinetica acțiunii acestora, acțiunea nespecifică a anionilor.

Capitolul despre structura enzimelor, deși redus ca volum, prezintă în mod reușit concepțiile actuale despre structura proteinelor. Este dată greutatea moleculară a diferitelor enzime (care variază de la 9 000 pentru hidrogenaza 1.98.1.1 pînă la peste 1 000 000 pentru piruvatdecarboxilaza 4.1.1.1), numărul lanțurilor peptidice, alternanța aminoacizilor, structura terțiară a moleculei enzimatice. Importante sînt cercetările despre natura centrului activ al enzimelor (numărul acestor centri și natura chimică a grupărilor care leagă substratele de grupările din centrul activ) și despre structura grupării prostetice. Un tabel prezintă aminoacizii conținuți în 22 de enzime diferite.

Un capitol de enzimologie în care s-au realizat progrese mari în ultimii ani este cel referitor la formarea enzimelor. Autorii prezintă concepțiile actuale despre controlul genetic al sintezei proteinelor, formarea ARN-mesager, formarea proteinelor în ribozomi, natura codului polinucleotidelor, inducția și represia formării enzimelor de către gene și metaboliți. O categorie importantă de factori, evidențiată deocamdată la organisme inferioare, sînt operonii, grupări consecutive de gene care acționează ca o unitate asupra sintezei proteice. Sînt prezentate cercetările asupra genelor reglatoare care asigură un control specific al intensității sintezei enzimelor și a grupelor de enzime, cum sînt lucrările lui Novick și Horiuchi (1961) asupra genei reglatoare pentru sinteza galactozidazei. Capitolul se încheie cu formarea enzimelor din diferiți precursori (pepsinogen, prorenina, tripsinogen, chimotripsinogen, procarboxipeptidaza, complexul pancreatic etc.).

Ultimele două capitole despre sistemele enzimatice și despre biologia enzimelor, cu care se încheie volumul, sintetizează bogatul material prezentat în capitolele anterioare și oferă o privire de ansamblu de o importanță practică deosebită pentru cele mai diferite domenii ale biologiei. Se arată că organizarea și coordonarea acțiunii numeroaselor sisteme enzimatice nu au loc printr-o anumită localizare a enzimelor în structurile celulare, ci pe baza specificității lor chimice. Sînt exemplificate legitățile interacțiunii diferitelor sisteme enzimatice. În 19 tabele sînt prezentate însușirile diferitelor sisteme polienzimatice, cum sînt cele referitoare la sinteza glicogenului, coenzimei A, nucleotidelor, fosfatidelor, formarea ureei în ficat, formarea zaharozei în procesul de fotosinteză etc. Este exemplificată localizarea enzimelor în structurile intracelulare, pe baza cercetărilor comparative : ale diferitelor țesuturi normale și patologice. Un tabel prezintă distribuirea a 59 de enzime în diferite țesuturi animale. Unul din progresele importante ale enzimologiei este cel privitor la formele moleculare multiple ale aceleiași enzime într-un singur țesut—izoenzimele, evidențiate cu ajutorul electroforezei de zonă, cum este cazul celor 5 izoenzime ale lactat-dehidrogenazei din serul normal uman, puse în evidență de Vesell și Bearn (1958) și Markert și Moller (1959). În încheiere este prezentată pe scurt enzimologia genetică : efectele mutațiilor, folosirea mutațiilor pentru elucidarea caracterului metabolismului și originea enzimelor în legătură cu problema originii vieții.

Ilustrarea materialului, cu 146 de figuri și grafice, judicios ales din literatură sau redate de autori după cercetări proprii, și cu numeroase tabele de sinteză, permite înțelegerea materialului, care este expus în mod sistematic și logic, la un înalt nivel științific, dar accesibil.

Deși la citirea acestei lucrări diferiți specialiști pot fi tentați să critice faptul că unele capitole sau unele probleme speciale sînt insuficient dezvoltate, este meritul prof. Dixon și prof. Webb de a fi realizat o neîntrecută monografie despre enzimologie, care reprezintă un instrument necesar celor ce lucrează în diferite domenii ale biochimiei și fiziologiei umane, animale sau vegetale.

C. T. Horovitz

Biochimie medicală, sub redacția prof. dr. I. Manta, Editura didactică și pedagogică, București, 1965, 768 p.

Lucrarea este întocmită după un plan care ține seama de rezultatele obținute în ultimii ani în domeniul chimiei celulare și al proceselor biochimice desfășurate în intimitatea structurilor subcelulare, o atenție deosebită dîndu-se progreselor realizate în domeniul hormonilor, enzimelor și metabolismului. Ea pleacă de la concepția justă că cercetarea biochimică de labora-

tor nu se mai poate menţine la vechile tipare strict practice şi trebuie completată printr-o explicaţie teoretică în legătură cu noile achiziţii fundamentale ale chimiei biologice.

Punctul de vedere care stă la baza lucrării — deşi nu este original — se cuvine subliniat. Autorii urmează linia logică a cunoaşterii prealabile a naturii chimice a componenţilor celulari (biochimia descriptivă), pentru ca după aceea să se ocupe de fenomenele biologice propriu zise. Cartea se adresează în primul rînd practicianului de laborator, dar poate fi consultată cu folos de orice medic dornic să se informeze în problemele schiţate mai sus. Lista colaboratorilor la redactarea lucrării — principalii responsabili cu această disciplină la catedrele noastre de medicină — este prin sine însăşi un indiciu al valorii lucrării.

Tratarea materialului este organizată pe patru mari capitole :

I. Constituenţii fundamentali ai organismului

II. Biocatalizatorii

III. Metabolismele intermediare

IV. Biochimia celulei, ţesuturilor, umorilor şi excreţiilor.

În toate aceste sectoare de bază, alături de fapte bine precizate şi cunoscute, aflăm date noi, recente, din domeniul biochimiei, selecţionate după criteriul importanţei lor din ansamblul cu adevărat imens al faptelor publicate în presa de specialitate. Fără a face abuz de date istorice, autorii prezintă la fiecare paragraf de bază cunoştinţele esenţial utile despre antecedentele problemei respective şi observaţiile primordiale care au deschis calea cercetării ulterioare în acel domeniu.

Capitolul despre enzimologie, disciplină cu vaste implicaţii, tratată astăzi în articole şi volume, poate fi dat ca exemplu de prezentare practic-selectivă şi în acelaşi timp didactică.

Este vorba, într-un cuvînt, de un manual de biochimie medicală şi nu de o lucrare despre analizele de laborator şi tehnica lor ; astfel de lucrări există în număr suficient astăzi în literatura noastră medicală. Biochimia medicală redactată de colectivul citat ne pune în contact strict cu problematica histologică medicală şi cu înţelegerea fenomenelor respective.

Chimist Elena Săndulescu

P. N. CAMPBELL şi G. D. GREVILLE, *Essays in Biochemistry* (Tehnici biochimice), vol. 2, Academic Press Inc., Londra şi New York, 1966, 227 p.

Începînd din anul 1965 a fost introdusă în literatura de specialitate o nouă publicaţie anuală : „Essays in Biochemistry". Scopul acestor „eseuri" cu subiect biochimic, aşa după cum rezultă din prefaţa primului număr al acestei apariţii, este să vină în ajutorul studenţilor, al proaspeţilor absolvenţi şi al celor care doresc să se specializeze în biochimie. Reiese că punerile la punct nu vor fi de o strictă specialitate şi nici nu vor fi prea detaliate, dar deoarece articolele sînt scrise de către specialişti consacraţi, cu o bogată experienţă didactică şi ştiinţifică, li se asigură, pe lîngă o claritate deosebită, şi o valoare ştiinţifică ridicată. Articolele nu sînt deci de popularizare, ci puneri la punct deosebit de valoroase nu numai începătorilor în biochimie. Această iniţiativă a Societăţii de Biochimie, sub auspiciile căreia apar aceste eseuri, este aşadar deosebit de utilă pentru ridicarea cunoştinţelor generale în domeniul biochimiei.

Înainte de a comenta conţinutul vol. 2 (1966), amintim că în primul volum, apărut în 1965, au fost inserate următoarele articole : „Rolul în metabolism al fixării CO_2" de H. G. Wood şi N. F. Utter, „Mecanismul contracţiei musculare" de R. E. Davies, „Determinarea secvenţei

acizilor nucleici" de K. Burton, „Fosforilarea oxidativă" de D. E. Griffits, „Biochimia masei verzi : lanţul fotosintetic de transportori de electroni în plante" de R. Hill.

Mergînd pe aceeaşi linie, în articolele apărute în vol. 2 tot în număr de 5, se discută de asemenea aspecte variate, la fel de importante ca acelea din primul volum şi scrise de biochimişti renumiţi.

Notăm că la sfîrşitul volumului se dă un index general de subiecte, cît şi unul cu autorii citaţi în toate cele cinci articole. De asemenea, pentru o mai bună informare, toate indicaţiile bibliografice sînt trecute cu titlul complet. Se remarcă faptul că accentul s-a pus pe lucrări recente de ansamblu, apărute în domeniul tratat, precum şi că fiecare articol este amplu ilustrat cu scheme generale metabolice, fotografii şi formule, fapt care măreşte eficienţa informaţiei şi posibilitatea de asimilare.

Să trecem pe scurt în revistă aceste articole.

Primul articol, scris de cunoscutul savant H. L. Kornberg, are ca subiect „Secvenţele anaplerotice şi rolul lor în metabolism" (29 pag. şi 40 indicaţii bibliografice). Aspectul tratat, anume acela al căilor auxiliare, directe ale principalelor căi metabolice prin care se realizează menţinerea la nivel constant al intermediarilor respectivi, este de mare actualitate. Se descriu, printre altele, secvenţele anaplerotice, la microorganisme, în cazul metabolismului substratelor cu 2 şi 3 atomi de carbon (acetat, glioxalat etc.), precum şi reglarea şi controlul fin al acestor secvenţe.

Lucrarea, una dintre primele care atacă acest aspect, ridică probleme deosebit de interesante, utile celor care studiază sau doresc să înţeleagă interrelaţiile existente între diferite cicluri metabolice. Problema fiind recent abordată (cea mai veche indicaţie bibliografică este din 1959), o serie de aspecte sînt interpretate ipotetic, ceea ce deschide căi noi de cercetare.

Articolul următor, scris de către D. G. Walker, se ocupă în 34 de pagini de „Natura şi funcţiile hexokinazelor în ţesuturile animale". Avînd în vedere că la majoritatea mamiferelor glucoza este cea mai utilizată sursă de energie, punerea la punct de faţă este deosebit de utilă.

După o trecere în revistă a modului de acţiune, a proprietăţilor şi a altor aspecte generale, se descrie rolul fiziologic al hexokinazelor în diverse ţesuturi ca : eritrocite, creier, muşchi, ţesutul adipos, ficat etc. Expunînd aspectele particulare specifice fiecărui ţesut, autorul insistă asupra rolului de reglare şi de control jucat de această enzimă, cît şi asupra implicaţiilor descoperite recent ale variaţiilor, condiţionate de nivelul substratelor, în activitatea hexokinazei din ţesutul dat. Articolul, deosebit de clar, descrie ultimele aspecte ale cercetărilor efectuate în acest domeniu şi beneficiază de o bibliografie bogată (106 indicaţii, dintre care foarte multe din 1965—1966).

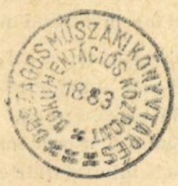
Cel de-al treilea articol se ocupă de „Metabolismul fosfolipidelor animale şi turnover-ul lor în membranele celulare", semnat de M. C. Dawson (49 pag., 161 trimiteri bibliografice şi 5 figuri cu principalele căi metabolice şi interconversiuni ale fosfolipidelor). Articolul este deosebit de util, fiindcă nu de mult, datorită faptului că tehnicile erau incomplet puse la punct, se considera că fosfolipidele sînt metabolic inerte. După o scurtă, dar temeinică trecere în revistă a cîtorva consideraţii asupra structurii fosfolipidelor, se dezvoltă mai amplu problema biosintezelor, notîndu-se participarea diverşilor donatori de grupări fosfat (citidin fosfatul de exemplu) şi a enzimelor specifice. Se arată apoi scindarea lor sub acţiunea fosfolipazelor şi se insistă asupra funcţiunilor şi a rolului lor în procesele de transport care au loc la nivelul membranelor celulare.

Urmează un articol care tratează despre „Agenţii contrareceptivi orali steroidali" şi este scris de V. Petrow. Se arată (în 28 de pag., 68 indicaţii bibliografice) rolul terapiei cu diverse substanţe, printre care şi acelea derivate de la progesteronă, în inhibarea ciclului oestral şi deci în prevenirea sarcinii. Articolul, cu un pronunţat aspect medical, este interesant prin aspectele prezentate cu privire la influenţele reciproce şi interrelaţiile existente între diverşii hormoni sexuali cu structură sterolică.

Cel de-al cincilea articol, scris de către G. H. Dixon, se ocupă de un aspect deosebit de actual, acela al „Mecanismului de evoluție al proteinelor". Acest articol (56 de pag. și 151 indicații bibliografice) este cel mai interesant, dar în același timp și cel mai greu de urmărit pentru cititorul care încă nu dispune de anumite cunoștințe suplimentare. Citirea este însă ușurată de un glosar al termenilor utilizați care, fiind de strictă specialitate, nu sînt accesibili decît celor familiarizați cu literatura respectivă. După o scurtă dar substanțială privire generală asupra mecanismului de biosinteză proteică, în care se arată participarea RNA și DNA cît și a secvențelor bazelor acestora, se expun metodele de studiu comparativ al proteinelor. Se arată apoi fazele de evoluție, mutațiile și selecția naturală a proteinelor, alterările cauzate de efectul evoluției, duplicarea genelor, cît și exemple de evoluție a unor proteine, în special cu caracter enzimatic.

Ca o concluzie generală, considerăm că toate cele cinci articole sînt un exemplu de claritate, documentare și ținută științifică. Ele ar trebui, după părerea noastră, să formeze subiectul unor seminarii speciale ale studenților din ultimii ani ai secției de biochimie, pentru a le veni în ajutor să înțeleagă multiplele și complexele probleme din domeniul căruia își vor dedica activitatea.

Dinu Tănăsescu



„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică* — în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări științifice din domeniul biochimiei (congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc.) ; *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : *str. Docenților nr. 20, București 2, Raionul 30 Decembrie.*

1967 MAR 8

LUCRĂRI APĂRUTE IN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMANIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA. **Acizii ribonucleici celulari şi virali,** 1966, 25×17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie,** 1966, 25×17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies,** 1965, 25×17.50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN,** 1966, 30,50×21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 10, NR. 1, P. 1—90, BUCUREŞTI, FEBRUARIE 1967

I. P. „Informaţia" — c. 4215

43 816

Lei 10.—

F1330

studii și cercetări de biochimie

2

TOMUL 10
1967

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 10, nr. 2, p. 91—186, București, mai 1967

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adrese comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:

București, *Str. Docenților nr. 20,*
Raionul 30 Decembrie

MŰSZAKI KÖNYVTÁR

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 10 (1967) Nr. 2

SUMAR

Pag.

A. BANDROVSKI, L. VLAD, Cercetarea funcţiei renale sub acţiunea tratamentului cu citostatice în cancer 93

M. CÂRSTEANU, Influenţa corticoterapiei generale asupra exosmozei electroliţilor din pielea umană în diferite stări patologice 99

N. ŞT. CHIŞIU, Relaţii filogenetice între batracieni, păsări şi mamifere (inclusiv om), reflectate în grupările antigenic-determinante ale unor proteine (Studiu de imunogenetică) 105

D. COTARIU, T. RĂDULESCU, Distribuţia sodiului între compartimentele intracelular şi extracelular ale muşchiului gastrocnemian de broască denervat 111

I. DINU, Studiul dinamic al influenţei cantităţii şi calităţii proteinelor alimentare asupra activităţii unor enzime hepatice 117

C. DRAGOMIRESCU, Determinarea greutăţii moleculare a lanţurilor polipeptidice L şi H din molecula de IgG de iepure prin cromatografie în strat subţire pe gel de Sephadex G-200 129

V. EŞANU, Energia de activare a reacţiilor catalizate de fosfataza şi apiraza din frunzele de tutun atacate de virusul mozaicului tutunului şi de ciuperca *Erysiphe cichoracearum* DC 135

E. GHIZARI, Influenţa radiaţiilor ionizante asupra activităţii ATP-azei din creierul de şoarece 137

M. KEREKES, E. GOINA, A. KOVÁCS, A. TÓTH, Acţiunea inhibitorie a arabinozei asupra activităţii tripsinei 141

I. A. MOLNAR, M. SIMIONOVICI, E. TUCICOV, C. M. GEORGESCU, J. WINTER, Acţiunea factorului lipotrop pancreatic asupra hiperlipemiei şi hipercolesterolemiei experimentale 145

G. SZEGLI, M. UNGUREANU, Determinarea greutăţii moleculare a unei proteaze şi a unei exotoxine bacteriene prin metoda cromatografiei de excludere 151

M. ŞERBAN, Studiul comparativ al fosfolipidelor din musculatura striată şi netedă prin cromatografie în strat subţire 155

E. TEODORU, S. GHEŢIE, Metodă simplificată de preparare a cistein-desulfhidrazei 161

D. WINTER, I. HÄDRICH, S. SAUVARD, C. STĂNESCU, Studiul toxicologic şi biochimic a doi derivaţi de vitamină B_1 cu resorbţie per orală superioară tiaminei. Nota 1. Indicele de toxicitate pe cale p.o. şi i.v. la şoarece şi nivelele sanguine la şobolan 167

D. WINTER, I. HÄDRICH, S. SAUVARD, C. STĂNESCU, Studiul toxicologic şi biochimic a doi derivaţi de vitamină B_1 cu resorbţie per orală superioară tiaminei. Nota 2. Eliminarea urinară după administrarea p.o. la om . . . 173

RECENZII 177

St. cerc. biochimie, tomul 10, nr. 2, p. 91–186, Bucureşti, mai 1967

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 93–97 (1967)

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

CERCETAREA FUNCŢIEI RENALE SUB ACŢIUNEA TRATAMENTULUI CU CITOSTATICE ÎN CANCER

A. BANDROVSKI şi L. VLAD

616 : 006.6 : 615.7

Rezumat. — S-au studiat 108 bolnavi cu diferite localizări de cancer sub acţiunea următoarelor citostatice : Endoxan, Thio-Tepa, Sarcolizin şi asociaţii între ele, urmărindu-se efectul lor asupra funcţiei renale prin ionograma sanguină şi urinară, coeficientul Van Slyke şi examenul urinii.

S-a constatat, în general, că tratamentul cu citostatice nu alterează funcţia renală decît în cazurile unor leziuni preexistente, care se accentuează în urma chimioterapiei.

Se cunoaşte din literatură [3], [5—11], [16], [21] că, în urma tratamentului cu agenţi citostatici, o parte din bolnavi manifestă diferite fenomene secundare, ca cistita acută sau hemoragică, din cauza produselor de degradare a citostaticelor ce se concentrează în vezică sau în căile aferente. Aceste fapte ne-au determinat să întreprindem un studiu mai amănunţit pentru a vedea dacă acest tratament alterează şi funcţia renală.

MATERIAL ŞI METODE

În acest scop am urmărit 108 bolnavi cu diferite localizări canceroase (mamar, uterin, pulmonar, sistem, vezică) şi trataţi cu agenţi alkilanţi. Bolnavii au fost împărţiţi în 4 grupe, după felul citostaticului administrat, şi anume : 21 bolnavi au fost trataţi cu Endoxan (4—9 g), 27 bolnavi au fost trataţi cu Thio-Tepa (50—270 mg), la 21 bolnavi s-a administrat Sarcolizină (50—150 mg), iar 39 bolnavi au fost trataţi cu asociaţii de cîte 2 citostatice, după cum urmează : Sarcolizină cu Thio-Tepa, Endoxan cu TEM, Endoxan cu Welbe, Trenimon cu Thio-Tepa sau Trenimon cu E_{39}. Administrarea acestor citostatice a fost făcută fracţionat sau în doză mare, unică, sub protecţie de autogreffă medulară. Administrarea fracţionată a fost efectuată intramuscular, intravenos sau intraarterial, prin intermediul unui cateter fixat în artera regională a organului lezat tumoral.

Majoritatea bolnavilor studiaţi erau în stadiile II, III sau IV, diagnosticul lor fiind confirmat prin biopsii, examene clinice şi date de laborator.

În toate cazurile s-au efectuat înainte de şi la diferite intervale după sfîrşitul tratamentului cu citostatice, în general la 15 sau 30 de zile, următoarele teste biologice : azotul neproteic, ionograma sanguină şi urinară, examenul complet al urinii şi coeficientul de epurare ureică Van Slyke. Metodele utilizate pentru aceste determinări au fost : metoda Van Slyke pentru azotemie, cantitatea totală de bicarbonaţi şi capacitatea de epurare ureică. Evaluarea cantitativă

a ionilor Na^+ şi K^+, atît din plasmă cît şi din urină, s-a efectuat la fotometrul cu flacără Synthèse ; clorul din plasmă s-a determinat prin metoda de titrare Volhardt, iar clorurile din urină prin metoda Mohr.

Examenul urinii a cuprins următoarele date : densitatea, pH-ul, albumina şi glucoza. Pentru decelarea eventualelor complicaţii hepatice s-au cercetat pigmenţii biliari şi urobilinogenul, iar pentru completarea examenului s-a determinat ureea şi s-a efectuat examenul microscopic al sedimentului. Datele biologice, exprimate numeric, au fost prelucrate statistic după metoda indicată de Lison [14] pentru aflarea deviaţiei standard. Pentru comparaţia rezultatelor s-au efectuat aceleaşi determinări la un grup de 25 de indivizi, clinic sănătoşi.

REZULTATE

Comparînd valorile medii ale ionogramei sanguine de la cele 4 grupe de bolnavi înainte de tratament (tabela 1), cu valorile obţinute la normali, observăm următoarele : azotul neproteic se menţine în limitele normale, valorile sodiului, potasiului, clorului şi ale rezervei alcaline sînt semnificativ mai mici decît limita inferioară a normalului ; valorile proteinelor totale la 2 grupe de bolnavi sînt normale, iar la celelalte 2 grupe sînt inferioare valorilor normale.

În ceea ce priveşte ionograma urinară (tabela 2), observăm că ionii potasiu, sodiu şi clor au valori scăzute faţă de normali. Dacă cercetăm examenul urinii, subliniem că din totalul fiecărui grup de bolnavi, avînd în vedere toţi parametrii enunţaţi mai sus, numai 4 sau 5 bolnavi aveau rezultate anormale, iar capacitatea de epuraţie ureică a acestor bolnavi se menţine aproape de limita inferioară a normalului.

Dacă analizăm rezultatele obţinute după tratamentul cu agenţi citostatici, observăm că nivelul valorilor rămîne în aceleaşi limite, fără variaţii semnificative statistic, în afară de cîte 4 cazuri din fiecare grup unde a existat iniţial o lezare a funcţiei renale, agravată sub citostatice, 3 din aceşti bolnavi decedînd cu comă uremică.

DISCUŢII

Majoritatea bolnavilor din acest studiu au fost trataţi prin chimioterapie regională intraarterială, deoarece prin acest procedeu, iniţiat de Klopp în 1950, Sullivan în 1959 [20] şi intrat în practică curentă [13], [15], [19], se ating două obiective importante, şi anume : *a*) infuzarea unei cantităţi considerabil mai mari de citostatice direct la tumoră şi în aria tumorală respectivă, efectuîndu-se doze care, administrate pe cale generală, ar fi letale pentru organismul uman ; şi b) diminuarea posibilităţilor de apariţie a unor forme grave de boală citostatică [15].

La acest lot de bolnavi am urmărit capacitatea rinichiului de a-şi echilibra balanţa acido-bazică, concentraţia electroliţilor şi funcţia excretorie. Se cunosc din literatură urmările survenite în urma tratamentelor cu agenţi citostatici ; astfel, Jensch [12], tratînd 35 de bolnavi cu azotiperită-N-oxid (NMNO) intravenos, pentru variate tipuri de tumori, găseşte la 7 bolnavi cistită, din care numai unul rămîne cu atrofia vezicii urinare, ceilalţi vindecîndu-se în urma tratamentelor adjuvante. Ulterior,

Tabela 1

Ionograma sanguină înainte și după tratamentul cu citostatice (valori medii ± eroarea standard a mediei respective)

Lotul		Azot neproteic*	K^+	Na^+	Cl^-	CO_3H^-	Proteine totale
Normali (25 cazuri)		0,25±0,009	5±0,02	142±1,8	102±9,6	25,6±1,1	17 ±0,2
Bolnavi tratați cu Endoxan	înainte (21 cazuri)	0,24±0,006	4,2±0,1	125±1,9	100±3,6	23 ±0,5	17 ±1,9
	după (21 cazuri)	0,37±0,03	4,2±0,1	130±2,2	97±2,4	23 ±0,5	17 ±0,5
Bolnavi tratați cu Thio-Tepa	înainte (27 cazuri	0,31±0,004	4,1±0,08	128±1,4	97±3,2	23 ±1,5	17,5±0,3
	după (23 cazuri)	0,36±0,1	4,1±0,1	130±6,0	92±3,8	24 ±0,8	16 ±0,3
Bolnavi tratați cu Sarolizin	înainte (21 cazuri)	0,29±0,03	4,2±0,1	126±2,1	93±3,6	23 ±0,6	15 ±0,6
	după (20 cazuri)	0,35±0,06	4,1±0,1	128±2,8	89±3,0	21 ±0,8	15 ±0,5
Bolnavi tratați cu asociații de citostatice	înainte (39 cazuri)	0,25±0,003	4,1±0,3	126±2,0	96±2,4	23 ±0,5	16 ±0,2
	după (39 cazuri)	0,32±0,02	4,0±0,3	132±1,7	94±2,0	23 ±0,4	15 ±0,3

* Ionii: Na^+, K^+, Cl^-, CO_3H^- și proteinele totale sînt exprimate în mEq/l.
Azotul neproteic în g/l de ser sanguin.

Tabela 2

Ionograma urinară și coeficientul Van Slyke înainte și după tratamentul cu citostatice (valori medii ± eroarea standard a mediei respective)

Lotul		K^+	Na^+	Cl^-	Examenul urinii	Coef. van Slyke
Normali (25 cazuri)		78±4,1*	143±2,5	12±0,4	Normal 100 %	80±3
Bolnavi tratați cu Endoxan	înainte (21 cazuri)	41±3,9	95±11	8,3±0,3	Normal 91 %	69±3,6
	după (21 cazuri)	51±3,4	96±12	8,0±0,6	Normal 77 %	69±3,6
Bolnavi tratați cu Thio-Tepa	înainte (27 cazuri)	38±2,7	57±6	7,7±3	Normal 86 %	68±2,4
	după (23 cazuri)	42±2,5	63±6,3	9±0,5	Normal 91 %	68±3,6
Bolnavi tratați cu Sarcolizin	înainte (21 cazuri)	52±3,1	93±3,6	8,9±0,5	Normal 77 %	73±4,5
	după (20 cazuri)	46±4,5	91±8,8	7,8±0,4	Normal 86 %	71±3,6
Bolnavi tratați cu asociație de citostatice	înainte (39 cazuri)	52±3,2	80±6,4	9,2±0,4	Normal 90 %	68±2,2
	după (39 cazuri)	54±2,4	80±4,1	9,1±0,3	Normal 90%	67±2,9

* Ionii K^+ și Na^+ sînt exprimați în mEq/l
Cl^- este exprimat în cloruri în g/l.

Cerutti şi Accinelli [4],[1], Schmidt [17] şi Philips [16] utilizînd Thio-Tepa, Metotrexat sau ciclofosfamidă intravenos sau infuzie intraarterială, au observat, pe lîngă consecinţele hematologice, la 2 din 90 de bolnavi cu diferite tipuri de tumori, o cistită aseptică care s-a vindecat prin întreruperea tratamentului cu citostatice.

Aceste observaţii le-am făcut şi asupra lotului de bolnavi analizat de noi, cînd 4 sau 5 bolnavi din fiecare grup, trataţi cu citostatice, au suferit în consecinţă o cistită acută sau hemoragică, manifestată prin prezenţa în urină a albuminei şi a hematiilor. Aceste fenomene secundare au putut fi remediate prin tratamente adjuvante sau prin întreruperea citostaticelor. Numai la 3 bolnavi dintre aceştia fenomenele s-au accentuat, ei sucombînd prin comă uremică. La examenul necropsic, s-au găsit la unul leziuni de nefrită interstiţială, la altul leziuni de glomeruli şi la altul o nefrită cronică sclerogenă. Deoarece ei au avut iniţial datele de laborator alterate, ilustrate prin acidoză, eliminări scăzute de electroliţi şi incapacitate de epuraţie ureică, putem să afirmăm că prezentau leziuni renale preexistente ce s-au agravat în timpul chimioterapiei.

CONCLUZII

În urma rezultatelor clinice şi a datelor de laborator obţinute în tratamentul cu agenţi citostatici asupra bolnavilor cu diferite localizări canceroase, putem să conchidem că toxicitatea agenţilor alkilanţi se adresează în particular căilor urinare inferioare. Practic, această toxicitate poate fi suspendată sau micşorată prin administrare de doze mici, asociate cu tratamente adjuvante.

Prezentată la redacţie la 10 mai 1966

Institutul oncologic, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Accinelli G., Merialdi A., *Bladder damage produced by irradiation combined with cytostatic agents in patients with cancer of the cervix.* Quad. Chir. Obst. Ginec., **17**, *9*, 583 (1962).
2. Bandrovski A., *Variaţiile electroliţilor sîngelui şi ţesuturilor în cancer*, în *Oncologie generală*, Edit. med., Bucureşti, 1961, p. 231.
3. Carlin M. R., *Urological complications following use of radioactive gold for carcinoma of uterine cervix*, J. urol., **78**, *15*, 650 (1957).
4. Cerutti R., *Clinical report on the toxicity of antitumor chemotherapeutic agents and methods of pharmacological protection*, Attualita Ostet. Ginec., **9**, *4*, 849 (1963).
5. Elmslie R. G., Mulholland A. T., Shields R., *Effect of operation on diurnal pattern of urinary potassium excretion*, Ann. Surg., **159**, 377 (1964).
6. Evans J. S., Ceru J., Mengel G. D., *Biological studies on streptovitacin A, a new antitumor agent*, Antibiotics Annual, 1958—1959, p. 565.
7. Fisher J. W., Roh B. L., *Influence of alkylating agents on kidney erythropoietin production*, Canc. Res., **24**, *61*, 983 (1964).
8. Golomb F. M., Postal A. H., Gumport S. L., Wright J. C., *Treatment of human malignant melanoma with actinomycin D*, Proc. Am. Assoc. Canc. Res., **4**, *1*, 24 (1963).
9. Irvine W. T., *Regional and total body perfusion of malignant tumours with cytostatic drug*, Modern Trends in Surgery, **1**, *10*, 164 (1962).

10. Ishii Y., Takeishi T., *Side effects of antitumor drugs and their treatment*, Sogo Igaku (Medicine), **20**, *6*, 437 (1963).
11. Iwata S., Nakamura J., Araki T., Yamanaka N., Veda G., *Biochemical studies on changes in body fluid components caused by antitumor therapy*, J. Jap. Soc. Intern. Med., **51**, *4*, 435 (1962).
12. Jensch L., *Treatment induced injuries to the urinary organs following the use of cytostatic agents*, Frankfurt Zschr. Path., **72**, *3*, 232 (1962).
13. Johnson R. O., Cureri A. R., *Intra-arterial chemotherapy*, Proc. Am. Assoc. Canc. Res., **1**, *4*, 32 (1963).
14. Lison L., *Statistique appliquée à la biologie expérimentale*, în *Coll. Sc. et Techn. d'aujourd'hui*, sub redacția M. B. Lepine, Edit. Gauthier et Villars, Paris, 1958.
15. Mark J. B., *External carotid and internal iliac artery catheterization in cancer chemotherapy infusions*, Surg., gynecol., obst., **118**, 596 (1964).
16. Philips Fr. S., Sternberg S. S., Cronin A., Vidal P. M., *Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity*, Can. Res., **21**, *11*, 1577 (1961).
17. Schmidt C. G., *Hemorrhagic cystites during cytostatic therapy*, Med. Welt, **6**, 306 (1963).
18. Statland H., *Fluid and electrolytes in practice*, Pitman Medical Publishing Co., Ltd, London, 1954.
19. Sullivan R., Miller E., Zurek W., *Clinical effects of prolonged (continuous) infusion of streptonigrin in advanced cancer*, Can. Chem. Rep., **33**, 4 (1963).
20. Sullivan R., Miller E., Siker M., *Antimetabolite — metabolite combinations cancer chemotherapy*, Cancer, **12**, *6*, 1248 (1959).
21. Watkin D. M., Steinfeld J. L., *Metabolic relationships between tumor and host during massive doses of prednison in human neoplastic disease*, J. Nat. Can. Inst., **33**, *1*, 149 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 99 – 104 (1967)

INFLUENŢA CORTICOTERAPIEI GENERALE ASUPRA EXOSMOZEI ELECTROLIŢILOR DIN PIELEA UMANĂ ÎN DIFERITE STĂRI PATOLOGICE

MIOARA CĂRSTEANU

612.616

Rezumat. — S-a urmărit exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea bolnavilor atinşi de diferite afecţiuni cutanate, trataţi cu substanţe de sinteză de tip cortizonic (supercortil şi superprednol). Determinările s-au efectuat pe pielea aparent sănătoasă a fiecărui bolnav, la diferite intervale de timp, corespunzătoare punctelor de maxim şi minim ale curbei respective de corticoterapie. Rezultatele obţinute arată că corticoterapia generală cu supercortil şi superprednol produce o creştere a exosmozei sodiului şi potasiului. Curba valorică a raportului dintre cantitatea de potasiu exosmozat şi cea de sodiu exosmozat are, în 92 % din cazuri, aceeaşi alură ca şi aceea a corticoterapiei aplicate. Exosmoza calciului nu prezintă valori semnificative.

Se ştie că o serie de afecţiuni ale pielii răspund la tratamentul cu corticoizi, utilizat atît de mult în ultima vreme. Astfel, ameliorări mai mult sau mai puţin rapide, uneori permanente, se obţin în dermitele alergice, în dermitele de contact, în lichenul plan, în unele forme de alopecie, în lupusul eritematos, pemfigus etc. [1].

Una din funcţiile principale ale hormonilor corticosuprarenali este aceea de reglare a metabolismului apei şi electroliţilor din organism (sodiu şi potasiu) [2—4]. Aceşti hormoni acţionează în mare măsură — însă nu în mod exclusiv — asupra tubilor renali. Efectele produse de ei sînt în parte extrarenale, deoarece aceşti hormoni par să influenţeze permeabilitatea de membrană a ţesuturilor în general [5]. Literatura referitoare la mecanismul de bază prin care steroizii cortico-suprarenali îşi exercită efectele lor profunde asupra metabolismului electroliţilor este foarte variată şi bogată. Pe scurt însă, deoarece una dintre funcţiile primare ale cortexului suprarenal este implicată în mobilizarea energiei necesare activităţii celulare, şi dacă acceptăm că celulele organismului îşi pot menţine compoziţia lor ionică caracteristică în baza unor procese energetice, atunci este normal ca hormonii cortico-suprarenali să influenţeze şi metabolismul electroliţilor.

Astfel, se ştie că insuficienţa cortico-suprarenală se caracterizează printr-un bilanţ sodic negativ în organism. Forţele osmotice deplasează apa din spaţiul extracelular în cel intracelular, în consecinţă volumul lichidului extracelular este scăzut, în timp ce volumul lichidului intracelular

este crescut [6]. Ca urmare, concentrația potasiului în lichidul extracelular crește, iar excreția renală este întîrziată, producîndu-se astfel un bilanț potasic pozitiv [7], [8].

În ceea ce privește acțiunea cortico-steroizilor asupra echilibrării balanței de sodiu și potasiu, s-a constatat că, dintre corticoizii naturali, aldosteronul este cel mai activ în stimularea retenției de sodiu, iar *11*-dezoxicorticosteronul este cel mai capabil să mărească în mod evident excreția potasiului și să reducă astfel nivelul potasiului extracelular [9], [10]. Acțiunea lor se exercită și reciproc, însă într-o măsură mult mai slabă.

Metabolismul apei este influențat de hormonii corticosteroizi prin acțiunea lor asupra metabolismului electroliților.

Dintre produșii sintetici de tip cortizonic, sînt curent utilizați azi în terapia afecțiunilor cutanate supercortilul sau prednisonul (*1*-dehidrocortizon) și superprednolul sau dexametazonul (*9*-α-fluoro-16-α-metil-prednisolon). Supercortilul este de cinci ori mai activ decît cortizonul (*17*-hidroxi-*11*-dehidrocorticosteron) în ceea ce privește efectele antiinflamatorii, scăzînd în același timp și retenția exagerată de sodiu care se produce la administrarea altor corticoizi. Superprednolul este de 190 de ori mai activ ca antiinflamator decît hidrocortizonul (*17*-hidroxicorticosteron), acțiunea de retenție a sodiului și de eliminare a potasiului fiind foarte mică.

Aceste date din literatură în legătură cu acțiunea cortizonicelor asupra metabolismului electroliților în organism ne-au sugerat ideea de a urmări variația exosmozei sodiului și potasiului din pielea bolnavilor tratați cu substanțe cortizonice de sinteză. Deoarece calciul este un cation important în metabolismul pielii și dat fiind că în lucrări anterioare [11], [12] am constatat o variație a exosmozei acestui cation într-o serie de afecțiuni dermice, am considerat util să studiem în această lucrare și exosmoza calciului din pielea aparent sănătoasă a bolnavilor tratați cu substanțe cortizonice de sinteză, chiar dacă metabolismul său nu este sub influența hormonilor corticosuprarenali.

MATERIAL ȘI METODĂ

Determinările au fost făcute pe 25 de cazuri (bărbați și femei) de lupus eritematos acut și cronic, dermatoze alergice cu exsudație importantă (eczemă, piodermită, intertrigo, dermite profesionale) și dermatoze alergice cronice (prurigo cronic).

Am considerat necesar să alegem o diversitate cît mai mare de boli în scopul de a urmări dacă eventualele modificări se datoresc efectelor cortizonice, independent de natura bolii.

Este știut că administrarea terapeutică a substanțelor sintetice derivate de la cortizon se face după o curbă care este în funcție de gravitatea afecțiunii și de reacționabilitatea organismului. După instituirea tratamentului cu substanțe cortizonice, doza se scade treptat, ajungîndu-se pînă la suprimarea ei, pe măsură ce manifestările clinice ale bolii se reduc.

În consecință, am urmărit variațiile exosmozei electroliților din pielea fiecărui bolnav atins de una din afecțiunile amintite, atît înainte de aplicarea tratamentului cu substanțe cortizonice, cît și la diferite intervale de timp corespunzătoare punctelor de maxim și minim ale curbei respective de corticoterapie, pentru a elucida în ce măsură acest proces de exosmoză este sub influența acțiunii substanțelor cortizonice.

Din gama substanțelor cortizonice de sinteză utilizate în terapia generală a afecțiunilor cutanate am ales supercortilul și superprednolul, ca fiind cele mai des întrebuințate și cu o eficacitate marcată.

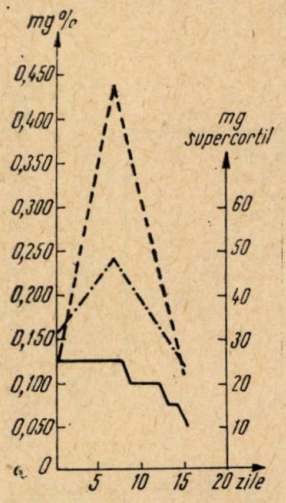
Pentru tratament, s-au utilizat, după caz, ca doză zilnică maximă, între 20 şi 80 mg supercortil sau între 3 şi 6 mg superprednol. Aceste doze erau scăzute în timp, pînă la anulare, iar durata întregului tratament a variat între 10 şi 80 de zile.

Determinările au fost făcute pe pielea aparent sănătoasă a acestor bolnavi (pe antebraţ), cunoscîndu-se din alte lucrări [11], [12] că o creştere faţă de normal a exosmozei sodiului, potasiului şi calciului la bolnavii cu dermatoze profesionale se manifestă şi la distanţă, adică în afara leziunii, pe pielea aparent sănătoasă; pe de altă parte, am considerat că în acest fel sîntem în afara oricăror variaţii care s-ar produce în timp datorită modificărilor histochimice la nivelul celulelor lezate.

Metoda utilizată a fost cea descrisă într-o lucrare anterioară [11].

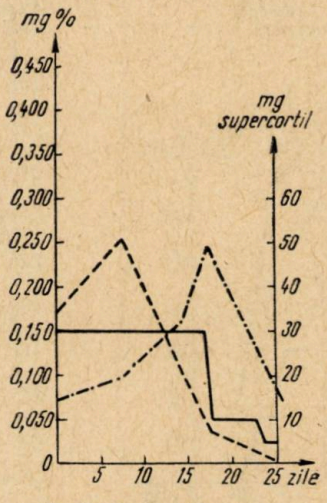
REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza rezultatelor obţinute reiese că exosmoza sodiului şi potasiului din pielea nelezată, aparent sănătoasă, a bolnavilor amintiţi, se caracterizează, înainte de aplicarea corticoterapiei, uneori prin valori cuprinse în limitele normale [13], iar alteori prin valori crescute faţă de normal. Aceste valori nu prezintă decît oscilaţii foarte mici în cazul repetării în timp o exosmozei la fiecare bolnav în parte, astfel că ele se pot considera practic constante la unul şi acelaşi caz şi sînt reprezentate în grafice prin valorile corespunzătoare timpului $t = 0$.



Graficul 1. — *Exosmoza sodiului şi potasiului din pielea umană în cursul corticoterapiei.*

——— corticoterapia
– – – concentraţia K în soluţie
– · – · – concentraţia Na în soluţie



Graficul. 2. — *Exosmoza sodiului şi potasiului din pielea umană în cursul corticoterapiei.*

——— corticoterapia
– – – concentraţia K în soluţie
– · – · – concentraţia Na în soluţie

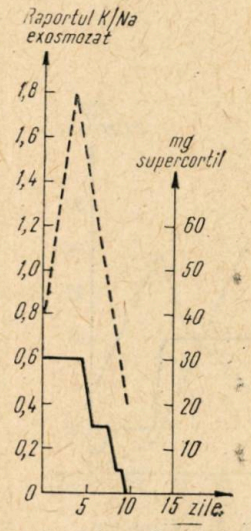
În toate cazurile însă, aplicarea tratamentului cu substanţe cortizonice (supercortil şi superprednol) atrage după sine o creştere a exosmozei sodiului şi potasiului din piele (graficele 1 şi 2).

Variațiile exosmozei sodiului și potasiului în cursul corticoterapiei se produc uneori în același sens (graficul 1); alteori, o creștere a exosmozei sodiului este concomitentă cu o scădere a exosmozei potasiului, și invers (graficul 2).

Scăderea dozei în tratamentul cu substanțe cortizonice aduce, în toate cazurile, o scădere a exosmozei sodiului și potasiului din piele (graficele 1 și 2). Încetarea corticoterapiei corespunde unor valori normale sau chiar subnormale ale exosmozei sodiului și potasiului din pielea aparent sănătoasă a bolnavilor studiați.

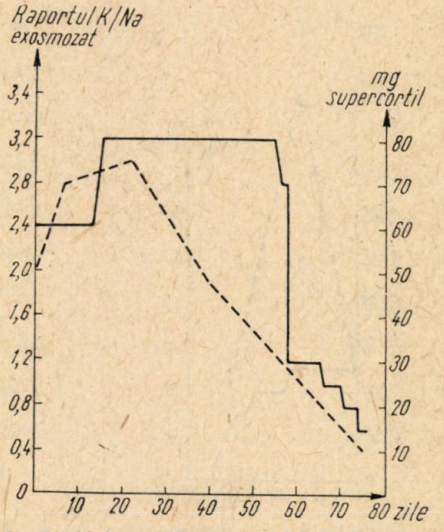
Am considerat necesar să exprimăm aceste date și prin raportul cantităților de potasiu/sodiu rezultate în urma exosmozei, referindu-ne în acest fel la echilibrul acestor ioni în procesul de exosmoză, și aceasta cu atît mai mult cu cît literatura de specialitate menționează cercetarea acestui raport în ceea ce privește cantitatea de potasiu și sodiu conținută în pielea umană normală [14].

Curba valorică a raportului potasiu/sodiu are aceeași alură, în 23 din 25 de cazuri, ca aceea a curbei corticoterapiei aplicate (graficul 3). Valorile maxime ale raportului exosmozei potasiu/sodiu se obțin în timpul tratamentului cu doza cea mai ridicată de supercortil sau superprednol, aplicată fiecărui caz, după specificul individual și al bolii. O dată cu scăderea dozei de substanțe cortizonice administrate scade și valoarea raportului cantităților de potasiu/sodiu rezultate în procesul de exosmoză.



Graficul 3. — *Cantitatea de K exosmozat raportată la cantitatea de Na exosmozat în cursul corticoterapiei.*

——— corticoterapia
– – – raportul K/Na



Graficul 4. — *Cantitatea de K exosmozat raportată la cantitatea de Na exosmozat în cursul corticoterapiei prelungite cu doză mare de supercortil sau superprednol.*

——— corticoterapia
– – – raportul K/Na

Această scădere valorică a raportului cantităților de potasiu/sodiu începe să se manifeste uneori încă în timpul administrării dozei celei mai mari de substanțe cortizonice, continuînd apoi să scadă paralel cu scăderea

dozei corticoterapice. Acest proces are loc mai ales în cazurile în care se aplică o doză mare de supercortil sau superprednol (80 mg, respectiv, 6 mg în 24 de ore) un timp îndelungat (30—60 de zile) (graficul 4). Există probabil un moment în care, după ce acțiunea substanțelor cortizonice a atins un maxim, funcțiile de autoreglare ale țesutului cutanat își reiau activitatea normală sub influența metabolismului general și tind să readucă sistemul la valoarea inițială, uneori coborîndu-l chiar sub această valoare.

Exosmoza sodiului și potasiului și raportul cantităților potasiu/sodiu rezultate în urma exosmozei, în condițiile cercetării noastre, nu prezintă diferențe caracteristice în funcție de sex, de substanța cortizonică utilizată sau de doza aplicată.

Exosmoza calciului nu prezintă variații semnificative.

Exprimarea grafică a datelor obținute de noi nu reprezintă o medie, ci cazuri individuale care evoluează similar la toți bolnavii tratați. Această situație este justificată de faptul că, în experimente de acest fel, cazul tipic confirmă regula. De asemenea, în grafice sînt expuse numai cazuri de tratament cu supercortil, pentru o unitate de prezentare, ținînd seama de faptul că și în cazurile de tratament cu superprednol se obțin rezultate cu totul asemănătoare.

CONCLUZII

Corticoterapia generală cu supercortil sau superprednol, aplicată la bolnavii cu afecțiunile cutanate amintite, produce o creștere a exosmozei sodiului și potasiului, în timp ce exosmoza calciului se menține constantă. Încetarea corticoterapiei corespunde unei exosmoze de sodiu și potasiu în limite normale sau chiar subnormale, fapt care traduce din punct de vedere biochimic influența tratamentului cu substanțe cortizonice asupra exosmozei acestor cationi din piele.

Raportul potasiu/sodiu exosmozat prezintă valori crescînde și descrescînde care, fără să urmărească acumulările cantitative ale substanțelor cortizonice în organism, traduc saltul calitativ al influenței lor.

Aceste modificări se datoresc faptului că exosmoza acestor electroliți din piele aparține probabil unor acțiuni fizico-chimice și unei sfere metabolice specifice acestui nivel, asupra cărora substanțele cortizonice acționează în mod caracteristic.

Mulțumim pe această cale dr. în med. Radu Dumitriu, șef de secție la Centrul dermato-venerologic al M.S.P.S. de sub conducerea acad. prof. dr. doc. Ștefan Gh. Nicolau, pentru sprijinul acordat în efectuarea acestei lucrări.

Prezentată la redacție la 25 iulie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. L. S. Goodman, A. Ph. D. Gilman, *Bazele farmacologice ale terapiei*, Edit. medicală, Bucureşti (1960), p. 1386 şi 1392.
2. R. F. Loeb, *Effect of sodium chloride in the treatment of a patient with Addison's disease*, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., **30**, 808, (1933).
3. R. F. Loeb, D. W. Atchley, E. M. Benedict, J. Leland, *Electrolyte balance studies in adrenalectomized dogs with particular reference to excretion of sodium*, J. Exper. Med., **57**, 775 (1933).
4. G. A. Harrop, L. J. Topper, E. Ellsworth, J. H. Trescher, *Studies on suprarenal cortex; plasma electrolytes and electrolyte excretiòn during suprarenal insufficiency in dog*, J. Exper. Med., **58**, 17 (1933).
5. C. H. Best, N. B. Taylor, *Bazele fiziologice ale practicii medicale*, Edit. medicală, Bucureşti, 1958, p. 791.
6. M. Gaudino, M. F. Levitt, *Influence of adrenal cortex on body water distribution and renal function*, J. Clin. Investig., **28**, 1487 (1949).
7. E. J. Baumann, S. Kurland, *Changes in inorganic constituents of blood in suprarenalectomized cats and rabbits*, J. Biol. Chem., **74**, 281 (1927).
8. S. A. Hastings, E. L. Compere, *Effect of bilateral suprarenalectomy on certain constituents of blood of dogs*, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., **28**, 376 (1931).
9. F. Gross, H. Gysel, *The action of electrocortin in the adrenalectomized dog*, Acta endocrinol., **15**, 199 (1954).
10. W. W. Swingler, R., Maxwell, M. Ben, C. Baker, S. J. Le Brie, M. Eisler, *Effect of aldosterone and desoxycorticosterone on adrenalectomized dogs*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **86**, 147 (1954).
11. M. Cârsteanu, *Exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană în diferite stări patologice*, St. cerc. biochim., **9**, 263 (1966).
12. R. Dumitriu, M. Cârsteanu, *Modificările exosmozei electroliţilor din piele la bolnavii atinşi de dermatoze alergice profesionale*, Fiziologia, *1*, 232 (1967).
13. M. Cârsteanu, *Exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană normală*, St. cerc. biochim., **8**, 177 (1965).
14. C. W. Eisele, L. Eichelberger, *Water electrolyte and nitrogen content of human skin*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **58**, 99 (1945).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 105 – 110 (1967)

RELAŢII FILOGENETICE ÎNTRE BATRACIENI, PĂSĂRI ŞI MAMIFERE (INCLUSIV OM), REFLECTATE ÎN GRUPĂRILE ANTIGENIC-DETERMINANTE ALE UNOR PROTEINE (STUDIU DE IMUNOGENETICĂ)

N. ŞT. CHIŞIU

576.8.097

Rezumat. — Prin tehnici de imunoelectroforeză şi dublă difuziune în agar, utilizînd seruri imune corespunzătoare, se pun în evidenţă componente antigenice cu identitate parţială sau totală, în ou (albuş şi gălbenuş) sau în serul sanguin la păsări aparţinînd la ordine, familii şi genuri diferite, în serul sanguin la unele mamifere (şoarece, iepure, om) şi în serul sanguin de broască.

Existenţa unor structuri antigenice comune la mai multe specii se interpretează în sensul persistenţei informaţiei genetice corespunzătoare în cursul evoluţiei, respectiv în cursul diversificării formelor de viaţă în procesul de evoluţie, avînd la origine un strămoş comun. Pe baza coincidenţei antigenice între specii se mai discută posibilitatea participării acestora la deschiderea unor procese imune cu caracter autoagresiv şi se fac rezerve asupra utilizării testelor de imunoprecipitare utilizate în medicina judiciară.

Expresia fenotipică cea mai apropiat corelată cu determinismul genetic al unei celule sau al unui organism o reprezintă proteina, agregat molecular care stă la baza organizării fenomenului de viaţă atît sub raport morfologic cît şi funcţional.

Prin structura lor primară, determinată de secvenţa aminoacizilor, şi prin structura lor secundară şi terţiară, corelate cu prima, moleculele proteice capătă un înalt grad de specificitate. Pe plan de organizare generală această specificitate răspunde unei funcţii biologice, iar diversitatea moleculară a proteinelor va fi tot atît de mare ca şi a rolurilor pe care sînt chemate să le îndeplinească. Organizarea generală şi expresia somatică a unei forme de viaţă dată îşi are garantat un înalt grad de stabilitate şi reproducere fidelă tocmai datorită informaţiei genetice care specifică sinteza proteinelor. Este dificil însă (din puncte de vedere tehnic) de întreprins cercetări pentru analiza codului genetic atunci cînd voim să facem comparaţii între proteine sau cînd — pe această cale — dorim să urmărim persistenţa unui patrimoniu ancestral în procesul de evoluţie al fiinţelor vii şi respectiv a relaţiilor genetice între ele.

Unele caractere ale moleculei proteice — ca expresie fenotipică fidelă a informaţiei genetice — sînt însă relativ uşor accesibile cercetării.

Printre acestea ar fi de o parte caracteristicele funcţionale (la enzime şi hormoni) şi pe de altă parte structura antigenică. Datele obţinute pe aceste căi ne dau informaţii preţioase, deşi nu reflectă obligator structura unei molecule proteice în întregime căci, pe de o parte nu întotdeauna grupările antigenic-determinante ale unei proteine sînt corelate cu funcţia sa (ex. un mutant la triptofan-sintetază) [13], iar pe de altă parte, într-o moleculă proteică se pot găsi — în locuri diferite — determinanţi antigenici diferiţi (specifici sau nu) şi pot exista, de asemenea şi aşa-zise zone mute.

Cu toate acestea, structura antigenică a unei molecule este socotită un indicator util în genetica moleculară şi s-a dovedit că ea poate da informaţii asupra caracterului specific şi persistenţei informaţiei genetice în cursul reproducerii. Structura antigenică reprezintă un criteriu de finețe pentru indicarea mutaţiilor ce pot surveni în genomul primar în cursul procesului de evoluţie, respectiv în procesul de apariţie a unor specii noi, în cazurile cînd reflectă modificări de ordin genetic.

Pe de altă parte, structura antigenică reprezentînd o expresie fenotipică a informaţiei genetice, poate evidenţia persistenţa de canale informaţionale ancestrale în filogenia formelor de viaţă existente astăzi în natură, respectiv poate furniza indicaţii despre evoluţia unor forme de viaţă dintr-un ancestor comun.

Un număr încă relativ mic de cercetări au utilizat acest criteriu în studii de evoluţie, adresîndu-se însă la grupe taxonomice mai mult sau mai puţin apropiate. Printre acestea le voi cita pe cele publicate de Williams şi Wemys [12], care studiază unele proteine serice la trei superfamilii din subordinul Antropoidee, pe James [5] care studiază , pe o scară zoologică largă alfa$_2$-macroglobulinele, şi pe Kaminski, autoarea a mai multor publicaţii privind înrudirea antigenică a ovalbuminei de la găină şi raţă [7] sau a siderofilinei de la om şi unele maimuţe [6]. Menţionăm apoi că astfel de cercetări au fost întreprinse şi la plante etc. Pentru aceasta citez studiul lui Pepys şi Longbottom [11], în care se indică existenţa unor structuri antigenice comune la *Aspergillus fumigatus*, nuca de palmier şi extractul de malţ (neprăjit), şi de asemenea lucrarea lui Daussant şi Grabar [4], care studiază pe aceleaşi criterii alfa — amilaza din boabe germinate de orz, grîu, secară, porumb şi ovăz.

În această lucrare am studiat înrudirea antigenică dintre proteinele din albuşul şi gălbenuşul de ou, uneori şi din serul sanguin, la patru ordine de păsări : anseriforme (raţa) ; columbiforme (porumbel şi turturea) ; galiforme (găină, curcă, bibilică) şi paseriforme (rîndunică şi cioară) ; proteinele şi lipoproteinele din serul sanguin la genul *Rana* din clasa *Amphibia* (broască), apoi de la om, iepure, şoarece (mamifere).

MATERIAL ŞI METODĂ

Se prepară pe iepuri următoarele seruri imune : antialbuş de ou de găină, antigălbenuş de ou de găină, antialbuş de ou de porumbel, antiser sanguin, de găină, antiser sanguin de porumbel. În acest scop albuşul, respectiv gălbenuşul de ou, recoltate proaspăt, sînt diluate cu ser fiziologic 1: 4, centrifugate 30 min la 6 000 t/m, apoi, în amestec egal cu adjuvant Freund complet, se injectează cîte 1 ml la iepure în plica iei (în două puncte separate). Operaţia se repetă de trei ori la 14 zile. La 10 zile după a 3-a inoculare se recoltează ser pentru control.

În funcție de calitatea serului imun obținut se repetă seria inoculărilor, după modelul descris anterior (1). Pentru serul antiser, amestecul cu adjuvant Freund se face fără diluții prealabile, după care injectările se execută conform cu protocolul de mai sus.

Alte seruri imune utilizate în acest studiu (ca ser imun de cal antiser om, ser imun de capră antiser iepure și ser imun de capră antiser sanguin de șoarece) au fost preparate la Institutul „Dr. I. Cantacuzino", ultimele de către dr. Olinescu.

Serurile imune de mai sus au fost utilizate apoi în analize imunochimice ca dublă difuziune în agar [10] și imunoelectroforeza simplă [3], combinate [9] sau comparativă*.

Pentru dublă difuziune ca și pentru imunoelectroforeză s-a utilizat agar Noble, soluție 1 % în tampon veronal/veronal sodic pH 8,6 forță ionică 0,05. Migrarea electroforetică s-a făcut într-un aparat cu răcire, sub 1,8 mA/cm timp de 1—4 sau 6 ore.

După realizarea arcurilor de precipitare, lamele au fost eluate, uscate și colorate cu sudan negru și apoi cu albastru de bromfenol.

Datele obținute au fost fixate în fotografii sau redate în diagrame.

REZULTATE

A. — Serul imun 504 (iepure antialbuș de ou de găină) identifică existența a 25 componente antigenice distincte în albușul de ou de găină (fig. 1).

Dintre acestea sînt prezente în albușul de ou de bibilică 12, în cel de curcă 10, la rață 6 și cîte 3 la porumbel și rîndunică (fig. 2).

Persistența informației genetice comune la speciile de mai sus este mai acentuată pentru grupul de globuline care electroforetic se situează în zona godeului de start.

Proba dublei difuziuni (după Ouchterlony), arată că proteinele din albușul de ou, precipitate specific în imunoelectroforeză de către serul imun 504, prezintă o identitate antigenică la speciile cercetate în raport cu găina, sau cel puțin unii determinanți antigenici conținuți de proteinele albușului de ou de la curcă, bibilică, rață, porumbel și rîndunică sînt prezenți — respectiv au un corespondent informațional genetic la găină — evidențiat în figurile 3 *A* și *B*.

Unele dintre componentele antigenice identificate în albușul de ou sînt prezente și în serul sanguin la speciile respective (probe pentru cocoș și porumbel în fig. 3 *A* și *B*).

Verificările imunoelectroforetice ne-au arătat că precipitările imune de mai sus sînt realizate de către anticorpi din clasa 7*S* (γG).

B. — Serurile imune 502 și 517 (iepure antigălbenuș de ou de găină) identifică componente antigenice comune în gălbenușul de ou de găină, în cel de porumbel și de curcă (fig. 4/c), în serul sanguin al acestora și în serul sanguin la turturea sălbatecă (fig. 4/*a*), la om (fig. 4/*a*), la iepure (fig. 4/*b*) și la broască (fig. 5).

Față de informația genetică ce guvernează sinteza proteinelor albușului de ou, cu tipare comune evidențiate aici numai la păsări, unele substanțe antigenice din gălbenușul de ou de găină recunosc o filiație ancestrală mult mai largă, încluzînd genuri, ordine și clase diferite. Aceasta sugerează

* N. ST. CHIȘIU, *Imunoelectroforeza comparativă* (lucrare în curs de publicare).

N. ȘT. CHIȘIU, *Completare la tehnica Osserman de identificare imunoelectroforetică a unor arcuri de precipitat imun din probe diferite* (date nepublicate).

o continuitate a informaţiei genetice de la batracieni (broască) la om, incluzînd ovipare şi mamalieni.

C. — Într-un cadru taxonomic mai strîns, serurile de iepure antiser sanguin de porumbel (724) şi antiser sanguin de găină (725) arată că proteinele şi lipoproteinele serice de la cocoş, gîscă, porumbel, turturea sălbatică şi cioară prezintă numeroase componente antigenice comune (fig. 6).

Apropierea şi respectiv îndepărtarea filogenetică dintre acestea este reflectată în numărul de componente antigenice comune puse în evidenţă de către serurile imune antiser de găină şi respectiv antiser de porumbel. Cele mai numeroase corespondenţe se găsesc în ser la turturea şi cele mai puţin numeroase în serul sanguin de cioară.

În relaţiile taxonomice dintre găină şi porumbel este de remarcat în special comunitatea informaţiei genetice pentru lipoproteine. De fapt şi informaţia genetică comună — taxonomic mai cuprinzătoare — relevată de serurile imune 502 şi 517 la broască, păsări, iepure şi om, se referea tot la o lipoproteină (fig. 4 şi 5).

D. — Cu serurile imune de capră antiiepure şi cal antiser sanguin uman se pun în evidenţă determinanţi antigenici comuni în alfa$_2$-macroglobulina serică şi în beta-lipoproteine la om, iepure şi şoarece (fig. 7 *a* şi *b*).

Înrudirea dintre lipoproteine este determinată de componenta proteică şi nu de haptena lipidică (ne referim la colesterol), căci reacţia este negativă cu gălbenuşul de ou de găină. Aceasta arată că informaţia genetică ce stă la baza sintezei acestei proteine este comună la om, iepure şi şoarece, probabil în structurile cistronale care specifică sinteza determinanţilor antigenici respectivi.

Că reacţiile de precipitare obţinute nu sînt precipitări nespecifice ci imunologice, s-a verificat prin electroforeza serurilor imune cu precipitare pe de o parte cu serul imun respectiv şi pe de alta cu antigenele corespunzătoare. Anticorpii precipitanţi erau din clasa 7 *S* (γG).

DISCUŢII

În măsura în care specificitatea unui anticorp precipitant este corelată cu specificitatea genotipului atunci cînd reacţionează cu structura antigenică a moleculei ce reprezintă expresia fenotipică directă a acestuia, reacţia de imunoprecipitare încrucişată între specii este un indiciu valoros pentru legătura filogenetică, respectiv înrudirea dintre speciile vizate.

În acest sens datele prezentului studiu arată că serurile imune preparate faţă de unele antigene provenite de la găină (ser sanguin, albuş şi gălbenuş de ou), precipită şi componente omoloage de la alte păsări, inclusiv unele de la mamifere, pe de o parte, şi de la batracieni, pe de alta. Alte seruri imune, cu specificitate de specie, verifică aceste date, indicînd o înrudire între diverse specii pe baza înrudirii unor antigene.

Înrudirea antigenică dintre proteinele omoloage de la specii diferite oferă posibilitatea interpretării fenomenului de evoluţie a formelor de viaţă pe bază de probe materiale riguros controlabile, evidenţiind — în coroborare cu caracterele diferenţiale rezultate din mutaţii — păstrarea în patrimoniul ereditar al speciilor a unor canale de informaţie genetică ancestrale.

Datele de filiație genetică obținute pe aceste criterii sugerează că la baza tuturor formelor de viață existente astăzi în natură ar sta un ancestor comun. Condițiile de mediu au putut exercita asupra acestuia influențe multiple — determinînd — în primul rînd — o îmbogățire a informației genetice primare, modificînd-o apoi, etapă cu etapă, în cursul evoluției istorice. S-a putut realiza astfel o diversificare în patrimoniul genetic și în expresia sa fenotipică, respectiv s-au format noi și noi specii, dar s-a păstrat — ca o legătură între ele — un cuantum de informație genetică comună, atestînd originea lor comună.

Din constatarea înrudirii antigenice, respectiv genetice, dintre specii atît de îndepărtate taxonomic ca cele cuprinse în prezentul studiu va rezulta o nouă orientare în înțelegerea unor procese patologice comune la mai multe specii, cum ar fi ateromatoza *, și se va deschide posibilitatea interpretării corecte a unor suferințe cu caracter de autoagresiune din clinica umană sau din cea veterinară ori experimental**. Se înțelege, spre exemplu, că un antigen — în totalitate sau în parte comun la mai multe specii — va putea deschide o reacție de tip autoimun la oricare dintre aceste specii dacă i se asigură contactul cu sistemul imunoformator al organismului respectiv și dacă acest contact este neobișnuit (cum ar fi proteinele tisulare sau unele produse de secreție externă din propriul organism) [1]. Pentru pătrunderea în organism a unor astfel de antigene din alimente, este de ajuns să survină o insuficiență a enzimelor proteolitice digestive [2].

Coincidența unor structuri antigenice între specii mai poate avea și alte consecințe practice. Între acestea, semnalăm aici precauțiile ce vor trebui luate în medicina judiciară atunci cînd se utilizează imunoprecipitarea pentru identificarea apartenenței de specie a unor produse***, inclusiv a petelor de sînge [4].

CONCLUZII

1) La păsări aparținînd unor grupări taxonomice diferite și relativ îndepărtate (ordine diferite) există unele componente antigenice comune, care sugerează descendența lor dintr-un ancestor comun.

2) Posibilitatea existenței unui canal de informare genetică, specificînd sinteza unei lipoproteine cu determinanți antigenici comuni la om, iepure, șoarece, găină și broască, arată o legătură filogenetică foarte largă în scara zoologică.

3) În baza acestor studii se întrevăd unele indicații practice privitoare la hibridare în zootehnie, la îmbunătățirea unor tehnici de identificare antigenică în medicina judiciară, la interpretarea etiopatogeniei unor boli

---

* N. Șt. Chișiu, *Aspecte genetice comune reflectate în factorii cu rol aterogen la iepure și om*, U.S.S.M., Soc. Histochim. citochim., Simpozion asupra „Histochimiei lipidelor la nivelul aparatului cardio-vascular în condiții normale și patologice", București, sept. 1966.

** N. Șt. Chișiu, *Absorbție intestinală de componente antigenice în tulburări digestive consecutive denutriției*, U.S.S.M., Soc. Nutr., Simpozion privind „fiziopatologia stărilor de slăbire", Craiova, oct. 1966.

*** N. Șt. Chișiu, M. V. Terbancea, *Determinanți antigenici comuni la unele specii de animale și om și posibilitatea interpretării eronate a unor teste de imunoprecipitare în medicina judiciară*, U.S.S.M., Simpozion de medicină judiciară, București, oct. 1966.

cu caracter de autoagresiune și la valoarea de extrapolare în clinica umană a unor date de patogenie obținute în experiențe pe animale (lipoproteine și ateroscleroză).

4) Se discută existența unor canale comune de informație genetică între specii, în sensul moștenirii acestora de la un ancestor comun.

Prezentată la redacție la 13 mai 1966

Laboratorul experimental Spitalul „Dr. I. Cantacuzino", București

BIBLIOGRAFIE

1. Chișiu Șt. N., *Constituenți antigenici proprii și de origine sanguină în bila hepatică și veziculară umană*, St. cerc. biochim., **8**, 427 (1965).
2. Chișiu Șt. N., *Cenzura proteinoclazică în absorbție de proteine și polipeptide din intestin*, St. cerc. biochim. *9*, 269 (1966).
3. Daussant Z., P. Grabar, *Comparaison immunologique des α-amylases extraites de céréales*, Ann. Inst. Pasteur, **110** (suppl. nr. 3), 79 (1966).
4. Fine F. M., *Apport des méthodes immunologiques récents au problème de l'identification du sang humain*, Ann. Inst. Pasteur, **93**, 592 (1957).
5. James K., *Study of the alpha$_2$-macroglobulin homologues of various species*, Imunology, **8**, 55 (1965).
6. Kaminski M., *Immunochemical studies on humain siderofilin. I. Enzimatic spliting of the antigenic structure of siderofilin.* II. *Cross-reactions of humain and monkey siderofilins*, Nature, London, **194**, 27 (1962).
7. Kaminski M., *Study of the cross-reactions of hen and duck ovalbumins. Immunochemical relationship between native proteins and precipitating frag ments obtained after proteolysis*, Immunol., **V**, 322 (1962).
8. Moraru I., Antohi Șt., *Introducere în genetica moleculară*, Edit. medicală, București, 1964.
9. Osserman E. F., *A modified technique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs*, J. Immunol., **84**, 93 (1960).
10. Ouchterlony O., *Antigen-antibody reactions in gels*, Acta path. microbiol. Scand., **32**, 231. (1953).
11. Pepys J., J. L. Longbottom, P. A., Jenkins, *Pneumoconioses par poussières végétales*, în B. Halpern ed., *L'antigénicité*, Edit. Med. Flammarion, Paris, 1964, p. 126.
12. Williams C. A. (Jr.), C. T. Wemyss (Jr.), *Experimental and evolutionary significance of similarities among protein antigens of man and the lower primates*, Ann. New York Acad. Sci., **94**, 77 (1961).
13. Janofsky Ch., P. S. Lawrence, *Gene action*, Ann. Rev. Microbiol., **14**, 311 (1960).

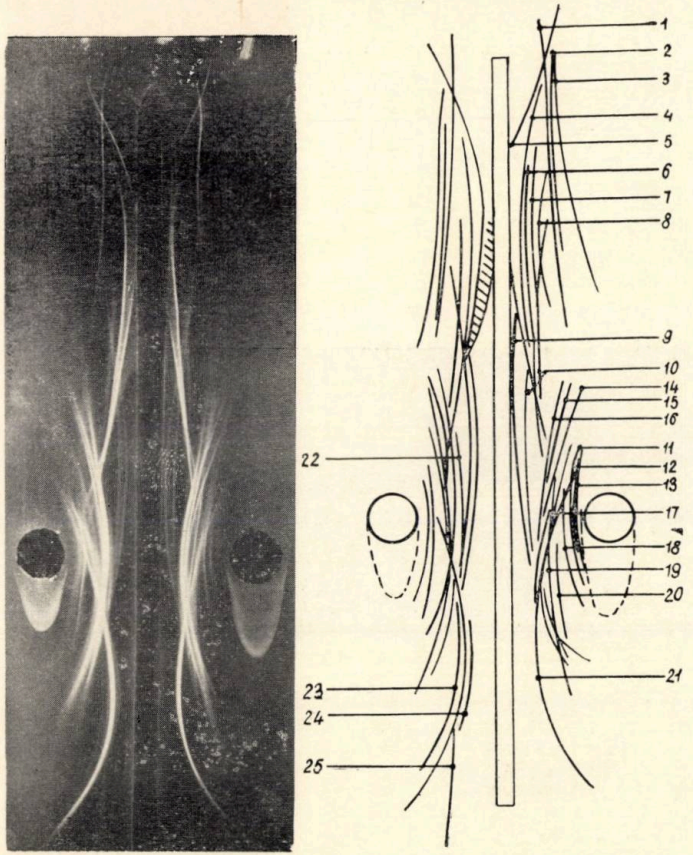


Fig. 1. — Imunoelectroforeza albuşului de ou de găină. În godeuri = 2 probe de albuş; în şanţ = ser de iepure (504) imunizat faţă de albuş integral de ou de găină; *1—25*= numărul de componente identificate.

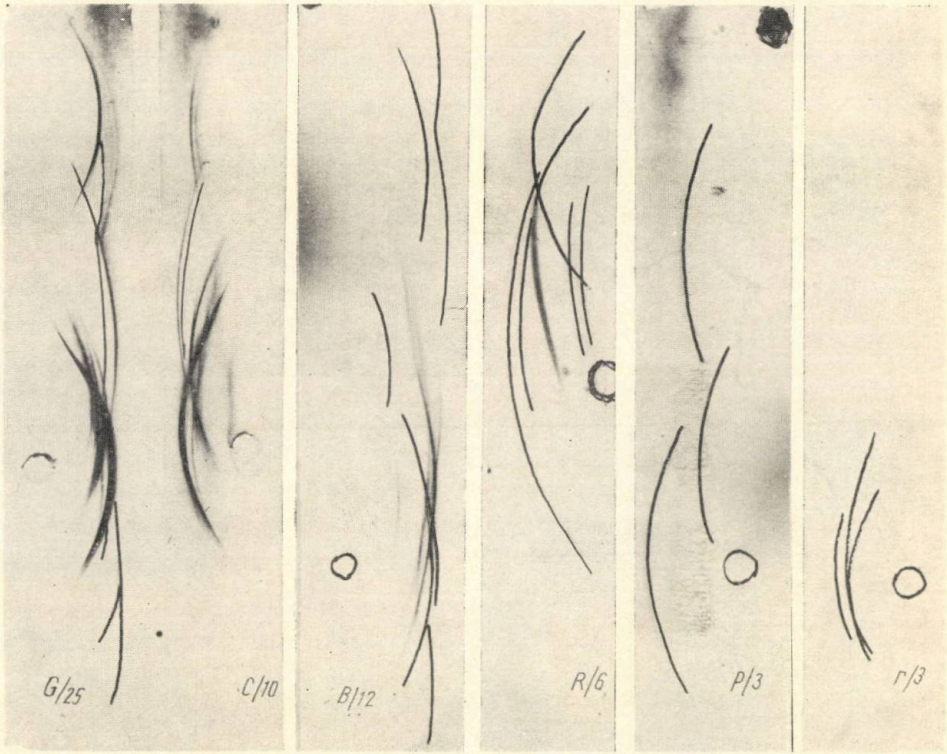
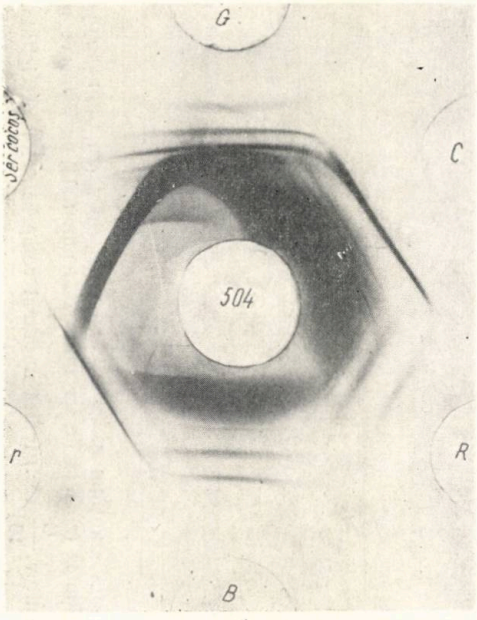
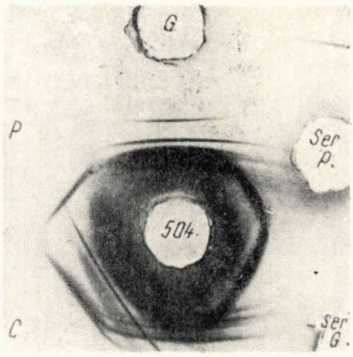


Fig. 2. — Imunoelectroforeza albuşului de ou de găină (*G*), curcă (*C*), bibilică (*B*), raţă (*R*), porumbel (*P*) şi rîndunica (*r*), faţă de ser imun de iepure (504) antialbuş de ou de găină. Cifra de la numitor $\frac{C}{10}$ etc.) indică numărul componentelor precipitate.

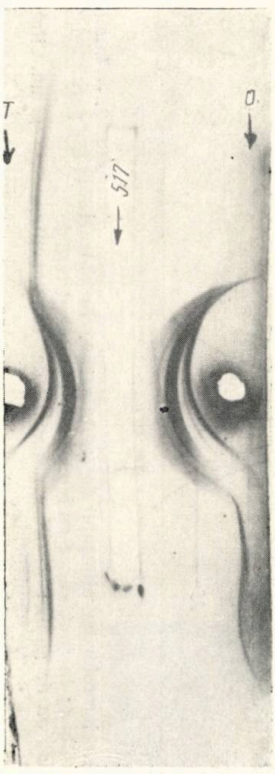


A

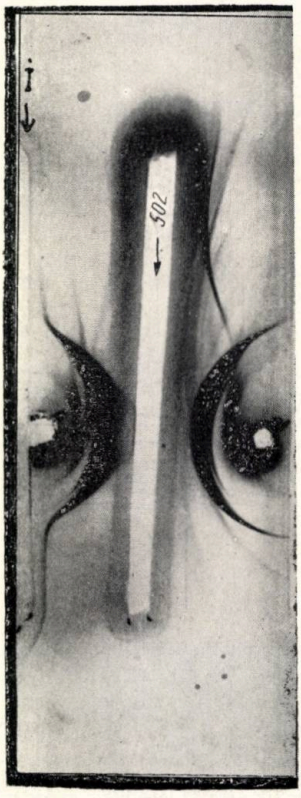


B

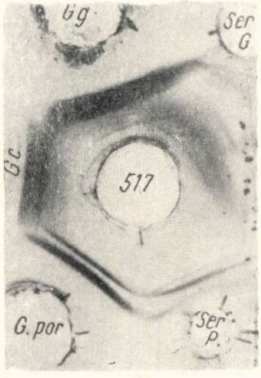
Fig. 3. — *A* şi *B*. — Dubla difuziune în agar (Ouchterlony) de albuş de ou de găină (*G*), curcă (*C*), raţă (*R*) bibilică (*B*), rîndunică (*r*), ser sanguin cocoş, ser sanguin porumbel (*ser P*) şi ser sanguin găină (*ser G*), contra ser imun (504) antialbuş de ouă de găină. Se remarcă reacţii de identitate antigenică (totală sau parţială) între albuşul de ou şi serurile sanguine de păsări aparţinînd unor genuri, familii şi ordine diferite.



A



B



C

Fig. 4. — Imunoelectroforeza gălbenuşului de ou de găină faţă de ser imun 517 (în *a*) şi 502 (în *b*) cu proba Osserman faţă de ser sanguin de turturea sălbatică (*T*), om (*O*) şi iepure (*I*). În *c*= dubla difuziune în agar de gălbenuş de ou de găină (*GG*), ser sanguin de găină (*ser G*), ser de porumbel (*ser P*), gălbenuş de ou de porumbel (*G. Por*) şi gălbenuş de ou de curcă (*G.C.*) contra ser imun de iepure (517) antigălbenuş de ou de găină.

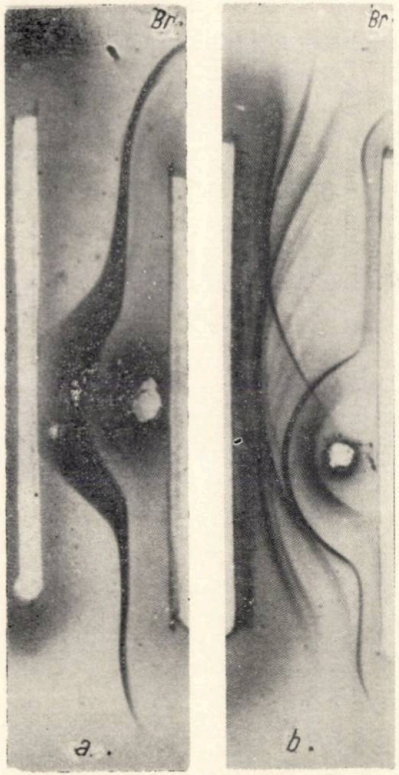
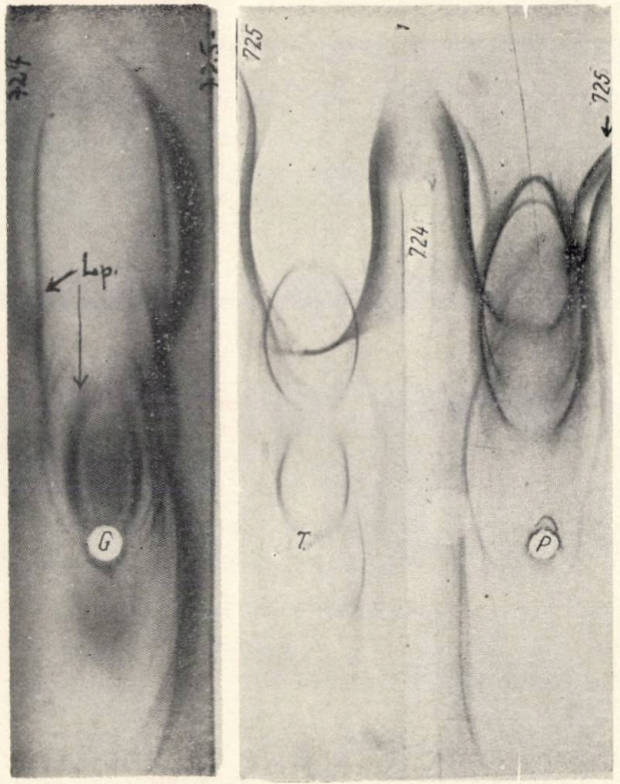
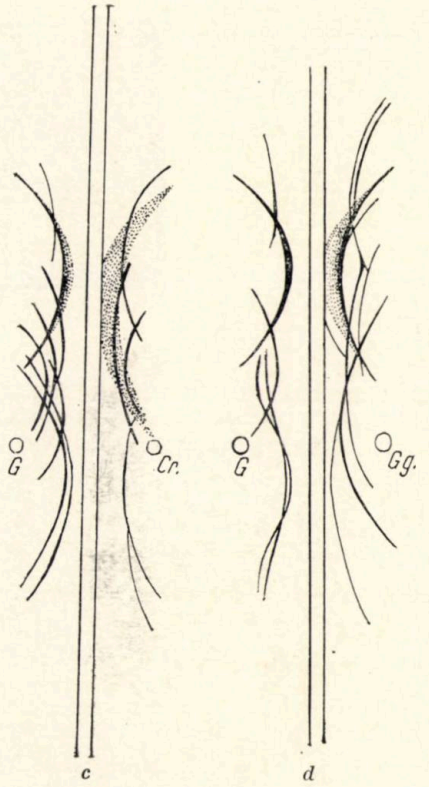


Fig. 5. — Imunoelectroforeza de gălbenuş de ou de găină contra ser imun anti-gălbenuş 517 (*a*) şi 502 (*b*), cu proba Osserman pentru ser sanguin de broască (*Br*). În *a* = coloraţie cu sudan negru ; în *b* = coloraţie cu albastru de bromfenol.



a *b*

Fig. 6 *a* şi *b*. — Imunoelectroforeza serului sanguin de găină (*G*), turturea (*T*) şi porumbel (*P*), contra ser de iepure imun antiser sanguin de găină (725) şi antiser sanguin de porumbel (724). *Lp* = lipoproteine.



c *d*

Fig. 6 *c* şi *d*. — Imunoelectroforeza serului sanguin de cioară (*Cr*), şi de gîscă (*Gr*) în paralel cu ser sanguin de găină, precipitate cu ser de iepure imun antiser de găină (725). Arcurile de precipitare în serurile de cioară şi gîscă sînt redate fidel. Pentru găină s-au copiat numai citeva arcuri de referinţă.

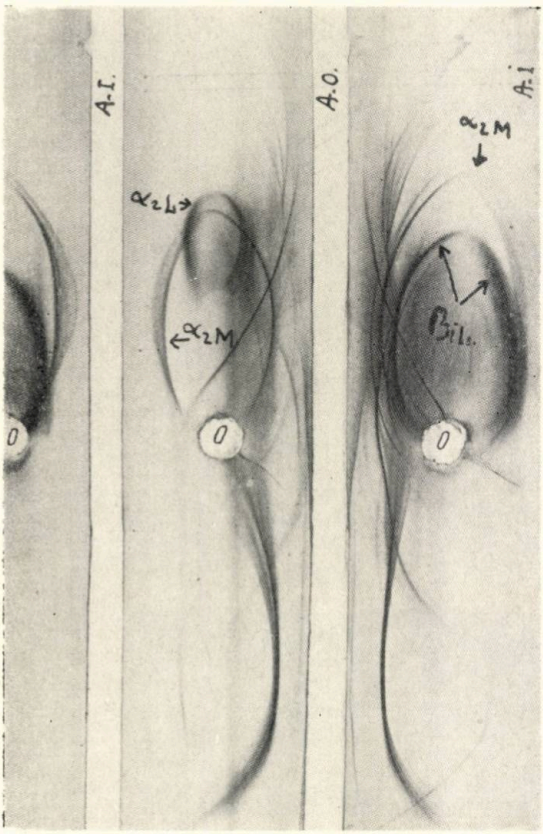


Fig. 7 *a*. — Imunoelectroforeza a trei seruri sanguine de om (*O*) contra ser imun de capră antiiepure (*IA*) şi ser imun de cal antiser om (*AO*); α2M = alfa$_2$-macroglobulina; β_1L = beta$_1$-lipoproteina; α2L = alfa$_2$-lipoproteina (colorație dublă cu sudan negru şi apoi cu albastru de bromfenol).

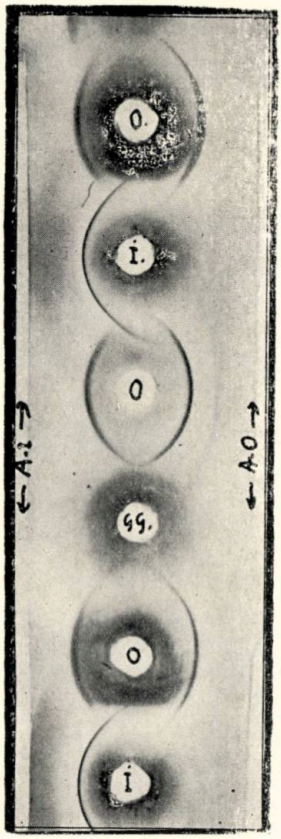


Fig. 7 *b*. — Dubla difuziune în agar de ser sanguin uman (*O*), ser sanguin de iepure (*I*) şi gălbenuş de ou de găină (*GG*), faţă de ser imun de cal antiser om (*AO*) şi ser imun de capră antiser iepure (*AI*); colorație cu sudan negru.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 111 – 115 (1967)

DISTRIBUȚIA SODIULUI ÎNTRE COMPARTIMENTELE INTRACELULAR ȘI EXTRACELULAR ALE MUȘCHIULUI GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ DENERVAT

D. COTARIU și T. RĂDULESCU

612.817.2

Rezumat. — S-a urmărit distribuția sodiului între compartimentele intra- și extracelular ale mușchiului gastrocnemian de broască normal, ca și după 1—8 zile de la secționarea nervului sciatic. Concentrația sodiului din mușchiul denervat crește progresiv începînd din a treia zi după intervenție. Distribuția sodiului între compartimentele intra- și extracelular se modifică după 24 de ore de la denervare : raportul Na intracelular/Na extracelular scade în primele 48 de ore, marcînd apoi o creștere progresivă pînă la sfîrșitul intervalului studiat. Se discută semnificația modificărilor puse în evidență, în legătură cu întreruperea transmisiei nervoase.

Secționarea nervilor sciatici are ca rezultat modificarea mai mult sau mai puțin accentuată a conținutului cationic al mușchiului striat. Astfel, Humoller și colab. [1] semnalează că, începînd din a treia zi după denervarea mușchiului gastrocnemian de șobolan, cînd fenomenul de atrofie este deja instalat, apare o creștere a concentrației sodiului, care se accentuează cu timpul. După părerea acestor autori, modificarea este rezultatul fenomenului de atrofie care survine în urma secționării nervului. Pe de altă parte, în literatură există numeroase date care arată că neurotomia induce perturbări mai mult sau mai puțin accentuate ale metabolismului muscular, înainte de instalarea fenomenului de atrofie [2—5]. De asemenea, în multe cazuri perturbările metabolice ale mușchiului atrofiat în urma neurotomiei sînt mai pronunțate sau chiar diferite de cele din mușchiul atrofiat după tenotomie [6—8].

Pornind de la faptele semnalate și ținînd seama de rolul important al cationilor în biochimismul muscular, ne-am pus problema dacă întreruperea transmisiei nervoase nu induce anumite modificări precoce ale schimburilor ionice din mușchi, înainte de instalarea atrofiei. Într-adevăr, în cercetări anterioare [9] am observat o creștere a difuziei sodiului din mușchi chiar numai la 24 de ore de la denervare. Noi am atribuit acest fenomen unei măriri a gradientului de concentrație a sodiului în compartimentul extracelular, determinată de modificarea distribuției sale între compartimentele intra—și extracelular, ca rezultat al întreruperii transmisiei nervoase. Pentru a verifica această presupunere, în lucrarea de față ne-am propus să cercetăm distribuția sodiului între compartimentele intra- și

extracelular ale muşchiului gastrocnemian de broască, la intervale scurte după secţionarea nervului, cînd fenomenul de atrofie încă nu este instalat (1—3 zile); am urmărit, de asemenea, variaţia raportului dintre sodiul intracelular şi cel extracelular, după apariţia fenomenului de atrofie (3—8 zile).

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe muşchi gastrocnemian de broască Rana ridibunda. S-a lucrat pe loturi de broaşte în greutate de aproximativ 40 g, la care nervii sciatici au fost secţionaţi, ca martor servind broaşte normale. Muşchii au fost prelevaţi după 1, 2, 3, 4, 6 şi 8 zile de la denervare. Determinarea sodiului s-a efectuat la fotometrul cu flacără Zeiss, în extractul obţinut prin tratarea muşchiului cu acid acetic diluat cald [10]. Această metodă permite extragerea rapidă şi practic totală a sodiului.

Determinarea sodiului din compartimentele intracelular şi extracelular a necesitat utilizarea celor doi muşchi simetrici (ambii normali sau ambii denervaţi). După prelevarea muşchilor, unul este introdus în soluţie izotonică de zaharoză (0,25 M) care conţine 2,5 mM potasiu şi calciu [11]; sodiul din compartimentul extracelular difuzează în soluţie. Se poate considera că muşchiul astfel tratat conţine în exclusivitate sodiu intracelular; celălalt muşchi, netratat, conţine sodiul total. Diferenţa dintre valorile sodiului obţinute la cei doi muşchi simetrici corespunde sodiului extracelular.

Cantitatea de apă totală s-a calculat făcînd diferenţa dintre greutatea muşchiului umed şi aceea a muşchiului uscat timp de 18 ore în etuvă la 110°C, pînă la greutate constantă. Din aceste valori s-a calculat cantitatea de apă, în procente.

Valorile sodiului, prezentate în lucrare, sînt exprimate în mM per kg de ţesut umed şi reprezintă mediile a cîte 10 determinări.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În figura 1 este prezentată variaţia concentraţiei sodiului total din muşchiul gastrocnemian de broască, după 1—8 zile de la denervare. După cum reiese din figură, concentraţia sodiului rămîne practic constantă în primele două zile după intervenţie. Începînd din a treia zi şi pînă la sfîrşitul intervalului studiat, se constată o creştere progresivă. Datele noastre concordă deci cu rezultatele obţinute de Humoller şi colab. [1] referitoare la creşterea concentraţiei sodiului în muşchiul gastrocnemian de şobolan după trei zile de la neurotomie, adică după instalarea procesului de atrofiere a muşchiului.

Datele referitoare la variaţia concentraţiei fracţiunii intracelulare a sodiului sînt cuprinse în figura 2.

În acest caz se remarcă o scădere bruscă a concentraţiei sodiului intracelular după 24 de ore de la secţionarea nervului, scădere care se menţine şi după 48 de ore. Începînd din a treia zi se produce o creştere progresivă a concentraţiei sodiului, cu depăşirea valorii medii corespunzătoare lotului martor.

Variaţia concentraţiei fracţiunii extracelulare a sodiului este dată în figura 3.

Se constată o creştere bruscă a concentraţiei fracţiunii extracelulare a sodiului chiar după 24 de ore de la secţionarea nervului, creştere care se accentuează progresiv, pe măsura trecerii timpului.

Modificarea precoce a concentrației fracțiunilor intracelulară și extracelulară a sodiului, survenită înainte de instalarea atrofiei mușchiului

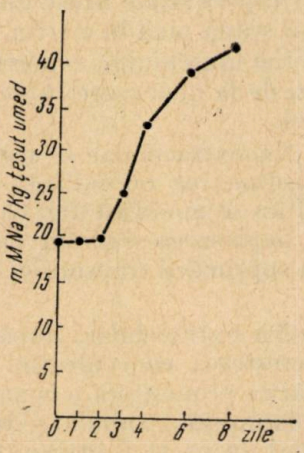


Fig. 1. — Variația concentrației sodiului total din mușchiul gastrocnemian de broască, după diferite intervale de la secționarea nervului.

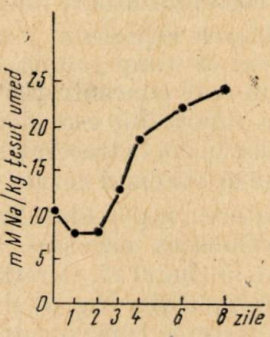


Fig. 2. — Variația concentrației sodiului intracelular din mușchiul gastrocnemian de broască, după diferite intervale de la secționarea nervului.

(1—3 zile de la denervare), confirmă — pentru aceeași perioadă — presupunerea noastră anterioară cu privire la distribuția sodiului între cele două compartimente [9]. Într-adevăr, întreruperea transmisiei nervoase este

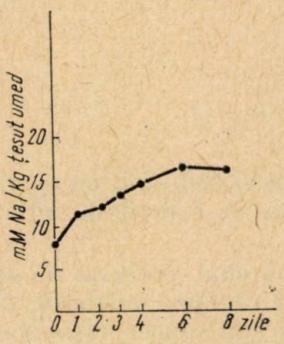


Fig. 3. — Variatia concentrației sodiului extracelular din mușchiul gastrocnemian de broască, după diferite intervale de la secționarea nervului.

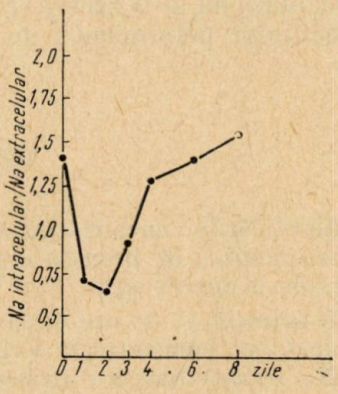


Fig. 4. — Variația raportului Na intracelular/Na extracelular la mușchiul gastrocnemian de broască după diferite intervale de la denervare.

însoțită de o scădere a sodiului intracelular, respectiv de o creștere a sodiului extracelular (fig. 2 și 3).

Modificarea raportului dintre fracţiunea intracelulară şi cea extracelulară a sodiului, survenită în urma denervării muşchiului, este redată în figura 4. După cum reiese din figură, acest raport scade brusc după 24 de ore de la secţionarea nervului şi continuă să scadă pînă în a treia zi. După acest moment, corespunzător instalării atrofiei muşchiului, raportul începe să crească progresiv, pentru ca în a opta zi de la denervare să depăşească valoarea corespunzătoare muşchiului normal.

Scăderea raportului Na intracelular/Na extracelular se menţine pe un interval de timp relativ scurt de la secţionarea nervului (1—3 zile), interval în care concentraţia sodiului total nu se modifică (fig. 1). Această scădere a raportului este determinată de deplasarea sodiului din spaţiul intracelular în cel extracelular, ca urmare a suprimării transmisiei impulsurilor emise de sistemul nervos central.

Creşterea raportului Na intracelular/Na extracelular, după trei zile de la secţionarea nervului, coincide cu creşterea concentraţiei sodiului total care, la rîndul ei, se reflectă într-o mărire pronunţată a concentraţiei sodiului intracelular (fig. 2) şi mai puţin pronunţată a sodiului extracelular (fig. 3). Creşterea concentraţiei sodiului total nu poate fi atribuită măririi spaţiului extracelular. Într-adevăr, Z. Drahota [12] găseşte o creştere a apei extracelulare abia în a zecea zi de la denervare. Cu acest fapt sînt în concordanţă şi determinările noastre, care au arătat că în perioada de opt zile după secţionarea nervului, apa totală variază doar între 80—83%.

Creşterea concentraţiei sodiului total, respectiv a concentraţiei fracţiunii intracelulare, poate fi pusă mai curînd pe seama creşterii relative a ţesutului conjunctiv, care leagă mai mult sodiu decît proteinele contractile [1].

Alături de aceste modificări ce apar ca rezultat al procesului de atrofie a muşchiului, nu ar fi exclus să se manifeste, într-o oarecare măsură, şi unele modificări determinate de suprimarea transmisiei impulsurilor nervoase.

CONCLUZII

1. Modificările concentraţiei şi distribuţiei sodiului, ce apar în muşchiul gastrocnemian de broască denervat, sînt în funcţie de intervalul de timp scurs de la intervenţie.

2. În primele 48 de ore de la denervare, cînd procesul de atrofie nu este încă instalat, concentraţia sodiului total rămîne constantă, dar scade raportul Na intracelular/Na extracelular (scade concentraţia sodiului intracelular şi creşte concentraţia sodiului extracelular).

3. După 3—8 zile de la denervare, cînd procesul de atrofie este deja instalat, se constată o creştere a concentraţiei sodiului total; raportul Na intracelular/Na extracelular revine treptat la valoarea martorului, datorită creşterii mai accentuate a concentraţiei sodiului intracelular şi mai puţin accentuate a celui extracelular.

4. Modifiările constatate în primele 48 de ore sînt atribuite suprimării transmisiei impulsurilor nervoase. Modificările constatate în perioada

de atrofiere a mușchiului (3—8 zile) sînt probabil determinate de creșterea relativă a țesutului conjunctiv care leagă mai mult sodiu decît proteinele contractile, dar și de suprimarea transmisiei impulsurilor nervoase.

Mulțumim lui T. Benția pentru asistența tehnică.

Predată la redacție la 29.XII. 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. Humoller, F. L., Griswold, B., Mcintyre, A. R., *Effect of neurotomy on the inorganic cation content of skeletal muscle*, J. Physiol., **33**, 723 (1950).
2. Dreyfus, J. C., Joly, M., Schapira, G., Raeber, L., C. R. Acad. Sc. **236**, 2351 (1953).
3. Drahota, Z., *Influence of denervation on potassium shifts in rat muscle*, in *Sborník prací Konf. o nervovém řízení metabolismu a aktivním transportu iontů*, Prague, 1956, p. 133—135.
4. Hudlická, O., Vrbová, G., *Changes in the blood flow and oxygen consumption of the hind limb in dogs after section of the sciatic nerve*, Physiol. Bohemoslov., **7**, 38—44 (1958).
5. Bass, A., Vodicka, Z., *Changes in the activity of hexokinase after work loading of muscles and their dependence on innervation*, Physiol. Bohemoslov., **5**, 58—62 (1956).
6. Padieu, P., *Biosynthèse des protéines musculaires et section du nerf moteur*, Bull. Soc. Chim. Biol., **41**, *1*, 57—67 (1959).
7. Hollósi, G., Benedeczky, I., Tigyi, A., Lissák, K., *The role of the nervous system in the maintenance of the RNA and DNA content of striated muscle tissue*, *Acta Biol.* Acad. Sci. Hungaricae, **11** *2*, 145—153 (1960).
8. Silakova, G. I., *Glutamine and glutamic acid of the skeletal muscles in motor denervation and tenectomy*, Ukrain. Biochim. Zkur., **29**, 221—232 (1957).
9. Rădulescu, T., Cotariu D., *The effect of denervation, narcosis and curarization on cation movements in striated muscles*, Rev. roum. biochim., **2**, *4*, 343—347 (1965).
10. Steinbach, B. H., J. Gen. Physiol., **44**, 1131 (1961).
11. Gillis J. M., *Les mouvements de l'eau dans le muscle strié isolé soumis à des tétanisations répétées*, Arch. Int. Physiol. Biochim., **72**, *1*, 154—170 (1964).
12. Drahota, Z., *Changes in extra- and intracellular water in rat muscle after denervation*, Physiol. Bohemoslov., **8**, 501—505 (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 117 – 128 (1967)

STUDIUL DINAMIC AL INFLUENȚEI CANTITĂȚII ȘI CALITĂȚII PROTEINELOR ALIMENTARE ASUPRA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME HEPATICE

ILEANA DINU

622-14

Rezumat. — S-a cercetat pe 120 șobolani albi influența în timp a regimurilor normo- și hipoproteice pe bază de cazeină și a unui regim maidic, asupra creșterii conținutului în proteine hepatice, acidului dezoxiribonucleic (ADN) și activității succin-dehidrogenazei (SD), transaminazei glutamic-aspartice (GOT), fosfatazei acide și alcaline.

Comparativ, la regimul hipoproteic se constată o scădere a proteinelor și a activității SD și GOT față de regimul normoproteic și o creștere a fosfatazei alcaline. Diferențele între cele două regimuri se instalează repede, după prima săptămînă. Datele referitoare la influența calității proteinelor arată existența unei creșteri a ADN, a proteinelor hepatice și a activității SD, fosfatazei acide și alcaline, precum și o scădere a activității GOT la regimul maidic. Diferențele se instalează treptat și se accentuează cu timpul.

Relația dintre alimentație și activitățile enzimatice tisulare constituie în ultimii ani obiectul a numeroase cercetări. Interesul față de această problemă este justificat de faptul că, pe de o parte, activitatea unor enzime reflectă valoarea nutritivă a alimentației, iar pe de altă parte, prin variația alimentației, s-au obținut modificări dirijate ale activității enzimatice, ceea ce contribuie la o mai bună cunoaștere a proceselor metabolice. În cadrul acestei probleme ample, atenția cercetătorilor este din ce în ce mai mult atrasă spre capacitatea de adaptare a activității enzimatice la oscilațiile alimentației. Ca model experimental s-au folosit rații alimentare cu variații extreme în conținutul a diverși factori nutritivi, urmărindu-se nivelul unor enzime specifice. Aceste cercetări au arătat că adaptabilitatea enzimatică nu este proprie numai anumitor enzime, ci mai multor sisteme enzimatice. Astfel, Harper, într-un studiu recent [7], subliniază că în termenul de adaptare pot fi incluse răspunsuri largi ca inducțiile enzimatice, de exemplu intensificarea sau scăderea pînă la pierdere a activității unor enzime, ca rezultat al creșterii sau îndepărtării substratului, sau apariția unei enzime corespunzătoare unui nou substrat.

Cercetările din acest domeniu se pot împărți în mai multe tipuri, în prima categorie intrînd studii care au demonstrat că o creștere a ingestiei proteice duce la creșterea sintezei și excreției de uree [2]. Al doilea tip de cercetări au arătat că activitatea enzimelor din ciclul ureei este net crescută la animalele supuse unei diete hiperproteice, ceea ce arată că organismul se adaptează la ingesta hiperproteică, sporindu-și enzi-

mele implicate în catabolismul aminoacizilor și producerea de NH_3 și uree. Unele enzime, ca xantin-oxidaza, succin-dehidrogenaza și D-amino-acid-oxidaza, scad la regimuri fără proteine, iar arginaza, uricaza și GOT cresc cînd proporția proteinelor din rație se mărește [1]. Deși relația dintre alimentație și enzime se află în stadiul „descriptiv", totuși datele obținute pînă în prezent arată că pentru unele enzime mecanismul de reglare acționează rapid, așa încît adaptarea enzimatică la compoziția regimului se face în cîteva ore.

În mai mică măsură s-a cercetat capacitatea unor sisteme enzimatice de a răspunde la modificări reduse în cadrul rației alimentare, adică mai apropiate de cele care se pot întîlni în practică.

În cercetările noastre ne-am propus să abordăm acest aspect al problemei, prin studiul variației în timp a activității unor enzime hepatice la o rație normoproteică și hipoproteică, pe bază de cazeină, și la o dietă hipoproteică alcătuită din porumb. În alegerea variantelor experimentale am ținut seama de rezultatele noastre anterioare [5], care au arătat că enzimele urmărite răspund nu numai la modificarea conținutului în proteine al rației alimentare, ci și la variația calității proteinelor în cadrul unor diete cu același conținut în azot. Totodată am pornit de la premiza că modificarea activității enzimatice, la un moment dat, nu permite să se aprecieze dacă e vorba de o reacție care se încadrează într-un proces fiziologic de adaptare sau într-un dezechilibru metabolic.

METODA DE CERCETARE

Experiențele au fost efectuate pe 120 de șobolani albi, în vîrstă de 3—4 săptămîni din aceeași generație, cu o greutate în jur de 40 g, împărțiți în 15 loturi, cîte 8 animale pe lot. Animalele au fost menținute în cuști individuale și hrănite *ad libitum* cu unul din următoarele 3 regimuri :

În prima serie de 5 loturi s-a folosit un *regim normoproteic*, care conținea : cazeină 18 %, amestec de săruri (după Osborne-Mendel) 4 %, ulei de floarea soarelui (*oleum helianthi*) 8 %,

Tabela

Influența cantității proteinelor
Date medii pe

Săptă-mîna	Greutatea finală : g			Ingesta : g/zi			Eficiența	
	Cazeină 18 %	8 %	P	18 %	8 %	P	18 %	8 %
I	52± 1,47	48± 2,49	>0,05	8,9± 0,6	8,6± 0,5	>0,05	2,10± 0,20	2,24± 0,29
II	74,9± 2,91	65,6± 3,09	<0,03	10,1± 0,41	10,5± 0,43	>0,05	2,12± 0,07	2,27± 0,23
III	94± 4,34	77,9± 3,36	<0,01	11,2± 0,25	10,5± 0,48	>0,05	1,87± 0,11	2,24± 0,15
IV	111± 5,54	96,4± 4,47	<0,05	11,9± 0,41	12,6± 0,39	>0,05	1,70± 0,07	2,01± 0,13
V	128,6± 8,96	112± 6,16	>0,05	12± 0,50	12,2± 0,52	>0,05	1,66± 0,09	2,09± 0,15

agar-agar 2%, drojdie de bere uscată 4% și amidon pînă la 100 g. La fiecare animal se administra săptămînal cîte 270 u.i. de vitamină A, 100 u.i. vitamină D_2 și 1 mg vitamină E. Conținutul regimului în azot era de 2,488 g%, ceea ce reprezintă 15,55 g% proteină brută.

În a doua serie de 5 loturi s-a întrebuințat un *regim hipoproteic* cu aceeași compoziție ca și primul, numai că proporția de cazeină a fost redusă la 8 g%, diferența completîndu-se cu amidon. Conținutul regimului în azot era de 1,552 g%, ceea ce reprezintă 9,7 g% proteină brută.

În a treia serie de 5 loturi, animalele au primit un *regim a cărui sursă de N era exclusiv mălaiul*, la care s-a adăugat 2 g% ulei de floarea soarelui și vitaminele A, D și E. Conținutul în azot al regimului a fost de 1,462 g%, respectiv 9,14 g% proteine.

La animalele din experiență s-a urmărit ingesta de alimente, prin cîntărirea mîncării o dată la 2 zile, precum și cîștigul săptămînal în greutate. Cunoscînd atît adaosul ponderal cît și consumul și compoziția regimului, s-a calculat eficiența proteică (cîștigul în greutate per gram de proteină ingerată). Săptămînal s-a sacrificat, prin decapitare, un lot de animale, recoltîndu-se ficatul. Într-un omogenat hepatic 10% în manitol (0,25 M) s-au determinat : conținutul în proteine totale, acid dezoxiribonucleic (ADN), precum și activitățile succin-dehidrogenazei (SD), transaminazei glutamic-aspartice (GOT), fosfatazei acide și fosfatazei alcaline. Metodele folosite au fost expuse în cercetări anterioare [5], [6]. Valorile obținute au fost prelucrate statistic și raportate la ficatul umed.

REZULTATE

Influența cantității proteinelor din regimul alimentar asupra dinamicii activității unor enzime hepatice

Fiind vorba de o experiență dinamică, în care săptămînal s-a sacrificat un lot de animale, pentru a evita neconcordanțele între loturi și erorile care pot decurge din acestea, am ales drept criteriu de control al evoluției loturilor proba de creștere (tabela 1).

1

asupra creșterii șobolanului alb.
lot (M ± ES)

proteică	Greutate ficat : g			Greutate ficat : g/100 g corp		
P	18%	8%	P	18%	8%	P
>0,05	2,4± 0,11	2,2± 0,92	>0,05	4,6± 0,11	4,5± 0,12	>0,05
>0,05	3,5± 0,23	2,9± 0,26	>0,05	4,6± 0,12	4,4± 0,16	>0,05
<0,05	4,4± 0,25	3,5± 0,16	<0,003	4,6± 0,15	4,4± 0,16	>0,05
<0,04	4,8± 0,27	3,9± 0,23	<0,01	4,3± 0,09	4,1± 0,13	>0,05
<0,02	4,7± 0,37	4,3± 0,29	>0,05	4,0± 0,14	4,0± 0,09	>0,05

În cele 5 loturi care au primit dieta normoproteică (18% cazeină), evoluția greutății corporale a fost aproape linear ascendentă, cu un cîștig în greutate de 17—23 g săptămînal, pe cînd în loturile menținute la regimul hipoproteic (8% cazeină) sporul ponderal a fost mai redus, variind între 12 și 18,5 g pe săptămînă. Efectul insuficienței de material azotat însumîndu-se, diferențele de creștere între loturile cu regim normo- și hipoproteic s-au accentuat în cursul observațiilor. Astfel, în prima săptămînă, lotul cu dieta hipoproteică prezenta o greutate numai cu 3,8 g mai redusă, pe cînd în a 5-a săptămînă deosebirea față de lotul cu regim normoproteic a atins 16 g. Această discrepanță apare cu atît mai semnificativă cu cît cantitatea de alimente ingerate a crescut deopotrivă în ambele loturi, de la 9 la 12 g pe zi.

La animalele care primeau dieta normoproteică sporul ponderal fiind mai important, eficiența proteică a scăzut de la 2,1 în prima săptămînă la 1,66 în a cincea, pe cînd la cele din lotul hipoproteic ea s-a menținut la valori care au oscilat între 2,01 și 2,27. În felul acesta au apărut diferențe între cele două loturi care s-au accentuat pe măsură ce timpul de observație s-a prelungit. Astfel, în prima săptămînă eficiența proteică a fost cu 6% mai crescută în lotul cu regim hipoproteic, iar în a cincea săptămînă diferența s-a ridicat la 25%, însă avantajele de utilizare în favoarea lotului hipoproteic nu au reușit să compenseze insuficiența disponibilului de material azotat, de unde accentuarea diferențelor în sporul ponderal.

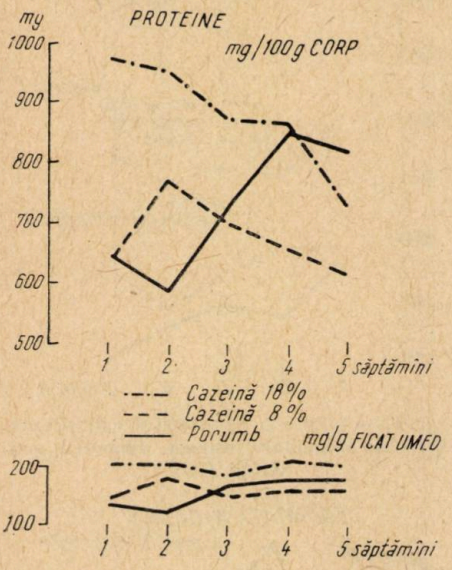
Greutatea ficatului (tabela 1) a crescut de la 2,4 g în prima săptămînă la 4,7 g în a cincea, fără să existe deosebiri semnificative în funcție de conținutul regimului în proteine. Raportată la 100 g corp, începînd din săptămîna a patra greutatea ficatului a scăzut în ambele loturi, iar diferențele față de prima săptămînă au fost semnificative ($p < 0{,}003$).

Conținutul în proteine totale (gr. 1) al ficatului, exprimat per g de organ umed, nu a prezentat diferențe esențiale în decursul celor 5 săptămîni, valorile oscilînd între 200 și 207 mg pentru loturile cu regimul normoproteic și fiind cu 15—43% mai reduse la animalele din loturile care au primit dieta hipoproteică. Raportat însă la greutatea corporală, conținutul în proteine a scăzut la loturile menținute la regimul normoproteic începînd din săptămîna a treia, diferențele față de prima săptămînă fiind net semnificative ($p < 0.001$), pe cînd la cele care au primit dieta hipoproteică el a prezentat oscilații nesemnificative. Exprimate și sub această formă, valorile sînt mai scăzute la loturile care au primit dieta hipoproteică, față de cele normoproteice, diferențele oscilînd între 17 și 31%.

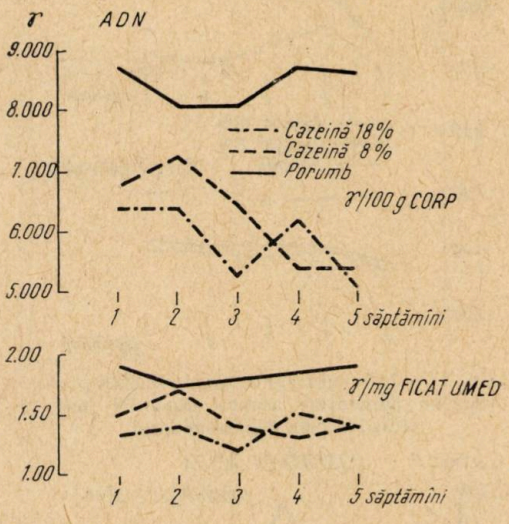
Conținutul în ADN (gr. 2) per mg de ficat umed a prezentat oscilații nesemnificative la animalele din loturile cu dietă normoproteică, pe cînd la cele cu dietă hipoproteică valorile au fost oscilante în primele trei săptămîni și au devenit semnificativ mai scăzute în ultimile două săptămîni. În primele 3 săptămîni, concentrația ADN la animalele care au primit dieta hipoproteică a fost cu 14—23% mai crescută decît în ultimele 2 săptămîni. Raportat la 100 g corp, conținutul în ADN la animalele cu dietă normoproteică nu a variat semnificativ în cursul observației, pe cînd la cele menținute la regim hipoproteic valorile au fost

cu 5—21 % mai mici, diferențele dintre săptămîna întîia și a cincea fiind statistic semnificative ($p < 0.001$).

Activitatea succin-dehidrogenazei (SD) (gr. 3), raportată la mg ficat umed, a variat nesemnificativ de la o săptămînă la alta în ambele serii



Gr. 1. — Influența în timp a cantității și calității proteinelor alimentare asupra proteinelor totale hepatice.



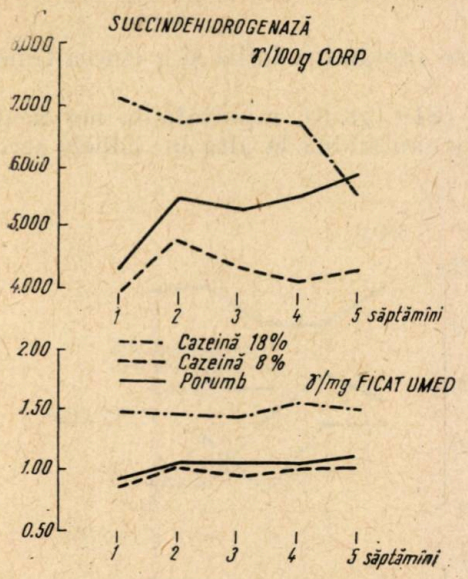
Gr. 2. — Influența în timp a cantității și calității proteinelor alimentare asupra concentrației ADN hepatic.

de loturi, însă valorile au fost mai scăzute la animalele care au primit dieta hipoproteică, diferențele variind între 29 și 68 %. Raportate la 100 g corp, valorile SD la loturile normoproteice au prezentat o tendință evidentă de scădere, diferențele între prima și ultima săptămînă fiind statistic semnificative ($p < 0.001$), pe cînd la cele care au primit dieta hipoproteică nici sub această formă nu au apărut deosebiri semnificative. Diferențele între cele două regimuri alimentare s-au ridicat la 29—80 %.

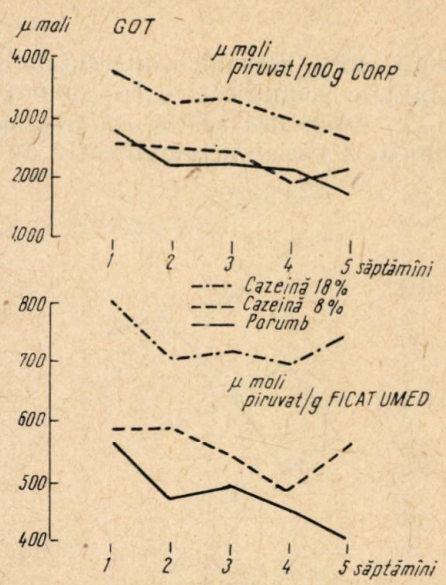
Activitatea transaminazei glutamic-aspartice (GOT) (gr. 4), exprimată per g de ficat umed, nu a variat semnificativ în cursul cercetărilor la animalele care au primit regimul normoproteic. Valorile găsite la animalele cu regim hipoproteic au fost cu 6—38 % mai reduse decît la cele care au dispus de un aport proteic adecvat. Deosebirea s-a accentuat (25—48 %) cînd activitatea enzimei s-a raportat la 100 g corp, deoarece prin această formă de exprimare valorile au fost semnificativ mai reduse la loturile normoproteice, în a cincea săptămînă.

Activitatea fosfatazei acide (gr. 5), raportată la gram de ficat umed, a oscilat nesemnificativ în ambele loturi, fără să existe între ele deosebiri demne de luat în considerare. Aceeași situație se păstrează cînd enzima se exprimă la 100 g greutate corporală, diferențele între cele două loturi în cursul primelor 4 săptămîni nedepășind 12 %.

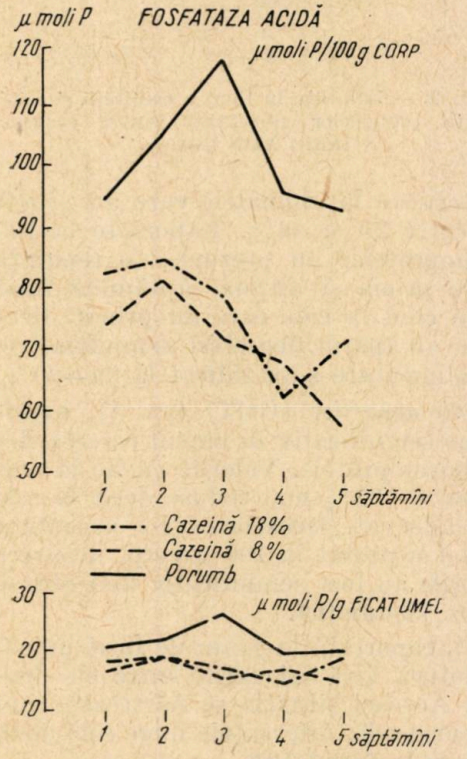
Activitatea fosfatazei alcaline (gr. 6), raportată la g de ficat umed, a prezentat oscilații nesemnificative atît la regimul normo- cît și la



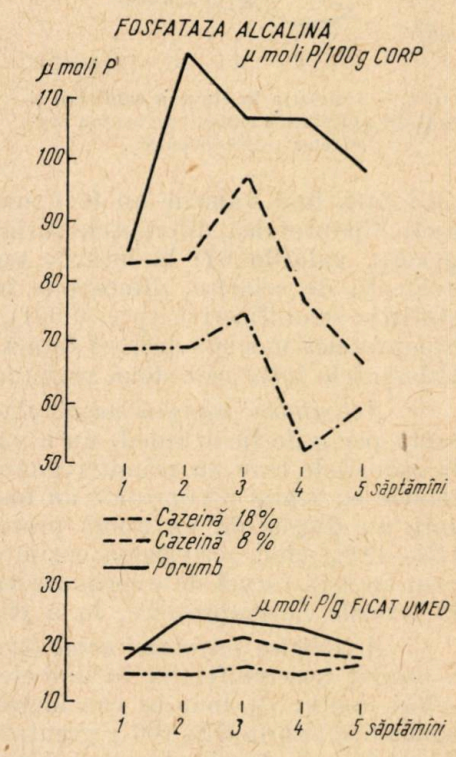
Gr. 3. — Influenţa cantităţii şi calităţii proteinelor alimentare asupra dinamici activităţii succin-dehidrogenazei



Gr. 4. — Influenţa cantităţii şi calităţii proteinelor alimentare asupra dinamicii activităţii GOT



Gr. 5. — Influenţa cantităţii şi calităţii proteinelor alimentare asupra dinamicii activităţii fosfatazei acide



Gr. 6. — Influenţa cantităţii şi calităţii proteinelor alimentare asupra dinamicii activităţii fosfatazei alcaline.

cel hipoproteic, însă în primele 4 săptămîni valorile au fost cu 27—23% mai mari la animalele cu regim hipoproteic, iar în ultima săptămînă ele au devenit similare. Cînd activitatea acestei enzime s-a raportat la 100g greutate corporală, în săptămîna a patra și a cincea, la loturile cu dietă normoproteică, a apărut o scădere semnificativă, neobservată la cele care au primit regimul hipoproteic.

Influența calității proteinelor asupra dinamicii activității unor enzime hepatice

Curba creșterii celor 5 loturi de animale care au primit regimul maidic (tabela 2) este mult aplatisată față de aceea a loturilor menținute la dieta care conținea aceeași cantitate de N furnizată prin cazeină. În timp ce cîștigul mediu în greutate la aceste loturi a fost de 15 g pe săptămînă, cele hrănite cu regimul maidic au slăbit în prima săptămînă cu 2 g și după aceea au crescut numai cu 3,6 g pe săptămînă. În cursul observațiilor, deosebirea s-a accentuat, după prima săptămînă diferența fiind de 28%, iar în a cincea săptămînă ea s-a ridicat la 94%.

Deși hrana s-a administrat *ad libitum*, animalele nu au compensat deficiența calității prin majorarea ingestei, ci, dimpotrivă, aceasta a fost mai redusă la loturile menținute la dietă maidică. În timp ce la șobolanii care au primit dieta cu cazeină ingesta a crescut de la 8,7 la 12,5 g pe zi, la cei supuși regimului maidic ea a crescut în prima săptămînă cu 4 g, iar începînd din a doua săptămînă a variat între 7,2 și 8,6 g pe zi. Este de remarcat că diferența între ingesta a fost de 51%, pe cînd deosebirea de spor ponderal în cele 5 săptămîni a atins 94%. În timp ce la dieta cu cazeină eficiența proteică a oscilat între 2,01 și 2,27, animalele ținute la regimul maidic au cîștigat numai 0,77 și 0,90 g per gram de proteină consumată.

Greutatea ficatului (tabela 2) a fost mai mică la animalele care au primit dieta maidică, și cu timpul diferența s-a accentuat, în prima săptămînă ea fiind de 29%, iar în a cincea ajungînd la 65%. În cursul experiențelor, greutatea ficatului a crescut cu 95% la animalele care au beneficiat de cazeină, pe cînd la cele care au primit materialul azotat numai din porumb creșterea a fost numai de 52%. Datorită deosebirilor de spor ponderal, greutatea ficatului, raportată la 100 g corp, în lotul supus regimului cu cazeină a scăzut semnificativ, pe cînd în cel menținut la dieta maidică ea nu a variat în cursul celor 5 săptămîni. Ca urmare, deosebirile dintre cele 2 grupe de loturi devin foarte semnificative ($p < 0.001$).

Concentrația proteinelor (gr. 1) per g de ficat umed a crescut în ambele variante dietetice. Dacă în primele două săptămîni concentrația în proteine a fost mai mare în lotul care a primit cazeină (cu 4 respectiv 44%), în următoarele săptămîni situația s-a inversat, creșterea fiind cu 8—13% mai mare în loturile cu regim maidic ($p < 0.05$). Deosebirea apare mai evidentă cînd rezultatele se raportează la greutatea corporală. În timp ce în loturile care au primit cazeină conținutul în proteine a scăzut cu 33%, la cele menținute la dieta maidică acest conținut a crescut pe toată perioada cu 27% ($p < 0.05$).

Conținutul în ADN (gr. 2) per mg de ficat umed a fost mai crescut la animalele care au primit dieta maidică, diferențele oscilînd între 24

Tabela

Influența calității proteinelor
Date medii pe

Săptă-mina	Greutatea finală : g			Ingesta : g/zi			Eficiența	
	cazeină 8%	Porumb	P	8%	Porumb	P	8%	Porumb
I	48,2± 2,49	37± 0,86	<0,001	8,6± 0,51	5,1± 0,18	<0,001	2,24± 0,29	0,91± 0,35
II	65,6± 3,09	46,6± 1,31	<0,001	10,5± 0,43	7,2± 0,36	<0,001	2,27± 0,23	0,81± 0,09
III	77,9± 3,36	50,8± 2,07	<0,001	10,5± 0,48	7,9± 0,42	<0,001	2,24± 0,15	0,90± 0,14
IV	96,4± 4,47	55,5± 2,00	<0,001	12,6± 0,39	8,5± 0,22	<0,001	2,01± 0,13	0,82± 0,10
V	112± 6,16	57,6± 2,38	<0,001	12,2± 0,52	8,1± 0,53	<0,001	2,09± 0,15	0,77± 0,07

și 46%. În timp ce la animalele care au primit regimul cu cazeină curba este descendentă, valorile din ultimele 2 săptămîni fiind semnificativ mai scăzute decît cele din primele două săptămîni ($p < 0,001$), la cele supuse regimului maidic curba prezintă oscilații nesemnificative, ceea ce face ca diferențele dintre cele două grupe de loturi să se accentueze în timp. Exprimînd conținutul în ADN la 100 g corp, deosebirea în funcție de calitatea proteinei alimentare este și mai frapantă, întrucît diferențele oscilează între 11 și 61% ($p < 0,001$).

Activitatea succin-dehidrogenazei (gr. 3) a evoluat asemănător cu conținutulul ficatului în proteine, adică a fost mai mare și a crescut mai mult în loturile cu dieta maidică, diferența fiind de 26% în prima săptămînă și de 41% în a cincea săptămînă, cînd eficiența enzimei la animalele care au primit materialul azotat din porumb a fost semnificativ mai importantă decît după prima săptămînă ($p < 0,001$). Aceeași deosebire s-a observat cînd activitatea enzimei a fost raportată la 100 g corp. Menționăm că diferența între prima și a cincea săptămînă, la animalele care au primit dieta maidică, este de 38% pentru SD și numai de 27% pentru conținutul în proteine.

Activitatea transaminazei glutamic-aspartice (gr. 4), raportată la unitatea de ficat, a oscilat nesemnificativ în loturile cu cazeină și a scăzut în cele care au primit dieta maidică, diferențele între prima și a cincea săptămînă fiind semnificative ($p < 0,005$). Datorită acestei scăderi, diferențele față de lotul cu cazeină s-au accentuat, trecînd de la 2% în prima săptămînă la 38% în a cincea. Cînd însă activitatea enzimei s-a raportat la greutatea corporală, curbele activității GOT nu au mai apărut deosebite în funcție de dietă și ambele au prezentat o tendință la scădere.

Activitatea fosfatazei acide (gr. 5), raportată la unitatea de ficat, a fost cu 16—62% mai crescută la animalele care au primit regimul maidic decît la cele menținute la dieta cu cazeină și nu au apărut diferențe semnificative în cursul celor 5 săptămîni de observație. Dacă activitatea

2

asupra creșterii șobolanului alb.
lot (M ± ES)

proteică	Greutatea ficat : g			Greutatea ficat : g/100 g corp		
P	8%	Porumb	P	8%	Porumb	P
<0,01	2,2± 0,92	1,7± 0,10	>0,05	4,5± 0,12	4,5 0,10	>0,05
<0,001	2,9± 0,26	2,2± 0,14	<0,02	4,4± 0,16	4,7± 0,14	>0,05
<0,001	3,5± 0,16	2,3± 0,10	<0,001	4,4± 0,16	4,5± 0,10	>0,05
<0,001	3,9± 0,23	2,6± 0,13	<0,001	4,1± 0,13	4,6± 0,12	<0,003
<0,001	4,3± 0,29	2,6± 0,16	<0,001	4,0± 0,09	4,6± 0,09	<0,001

enzimei s-a raportat la greutatea corporală, deosebirea în funcție de calitatea materialului azotat s-a accentuat cu timpul; în prima săptămînă animalele hrănite cu dieta maidică au prezentat valori numai cu 27% mai mari, iar în a cincea deosebirile au atins 60%.

Activitatea fosfatazei alcaline (gr. 6), raportată la unitatea de ficat umed, în prima săptămînă este apropiată la ambele diete, însă din a doua săptămînă curbele au evoluat diferit. În timp ce la dieta cu cazeină activitatea enzimei s-a menținut nemodificată, cu mici oscilații nesemnificative, la cea maidică curba se caracterizează printr-o tendință descendentă, deși valorile se mențin permanent mai crescute (cu 41%) decît la rația cu cazeină. În cazul regimului maidic, diferențele dintre prima și a doua săptămînă, ca și cele dintre a doua și a cincea, sînt semnificative ($p < 0,001$, respectiv $p < 0,01$). Raportată la 100 g corp, activitatea fosfatazei alcaline nu prezintă oscilații semnificative în funcție de calitatea materialului azotat, iar în ambele cazuri valorile concordă cu evoluția greutății corporale.

DISCUȚII

Rezultatele obținute arată că, la vîrsta cuprinsă între 3—4 și 8—9 săptămîni, la animalele supuse dietei normoproteice, nu au apărut modificări semnificative în concentrația proteinelor și a ADN, și nici în activitatea enzimelor cercetate. Valorile găsite pentru unii indicatori au crescut paralel cu greutatea corporală, însă pentru proteinele hepatice, succin-dehidrogenază, GOT și fosfataza alcalină creșterile fiind mai reduse decît sporul ponderal, în săptămîna 4—5 apar diferențe semnificative față de valorile din prima săptămînă. Pentru aceeași vîrstă, la animalele hrănite cu regimul hipoproteic, indiferent de modul de exprimare a indicilor studiați (la unitatea de ficat sau la 100 g corp), nu s-au produs modificări semnificative.

Din analiza comparativă a rezultatelor obținute la cele două nivele proteice, rezultă o diferență cantitativă a valorilor indicilor, fără să apară deosebiri calitative evidente. Diferențele observate în cursul celor 5 săptămîni se referă la o scădere a activității SD, GOT și a conținutului în proteine față de dieta normoproteică. În cazul fosfatazei alcaline valorile sînt mai crescute la dieta hipoproteică.

Datele obținute sînt concordante cu rezultatele cercetărilor noastre anterioare și ale altor autori [5], [9], [10] cu privire la influența conținutului în proteine al dietei asupra activității SD, GOT și fosfatazei alcaline. Ele arată că diferențele între cele două nivele proteice se instalează repede, după prima săptămînă de administrare a regimului. Faptul că diferențele între loturi nu se accentuează, iar activitatea enzimatică paralelează ritmul creșterii, arată că dieta hipoproteică pe baza de cazeină permite o dezvoltare echilibrată, însă la un nivel mai scăzut decît cea normoproteică.

Observații anterioare asupra efectelor depleției proteice, prin hrănirea cu diete sărace în proteine, au fost făcute cercetînd enzimele a căror activitate scade în aceste condiții.

Enzima cea mai studiată a fost xantin-oxidaza hepatică, considerată ca un indicator al calității proteinelor alimentare [8]. După Muramatsu și Ashida [9], activitatea xantin-oxidazei tinde să fie paralelă cu concentrația proteinelor hepatice, scăzînd cînd ingesta proteică se micșorează. Același lucru este valabil pentru succin-dehidrogenază și D-aminoacid-oxidază. Observații de acest fel duc la concluzia că reducerea activității enzimatice în cursul depleției proteice este o reflectare a pierderii de proteină hepatică, însă multe alte enzime din catabolismul aminoacizilor, ca de pildă arginaza, transaminazele glutamic-oxalacetică și glutamic-piruvică, glutamat-dehidrogenaza și altele [11], scad în ficatul animalelor hrănite cu o dietă săracă în proteine, fără ca scăderea să fie paralelă cu pierderea de material azotat hepatic.

Unele enzime, ca GOT și GPT, care scad cînd ingesta proteică este joasă [13], în afara rolului lor în sinteza aminoacizilor, au și rol în transformarea acestora în surse de energie ușor oxidabile, sau în gluconeogeneză. Aceste asocieri între modificările activității enzimelor metabolismului azotului și modificările în nevoile metabolice ale organismului pot fi interpretate ca răspunsuri adaptive, care contribuie la menținerea homeostazei.

Harper, într-un studiu de sinteză despre efectele variațiilor ingestei proteice asupra enzimelor din metabolismul proteic [7], arată că la animalele cu o dietă proteică joasă crește nevoia pentru înglobarea aminoacizilor în proteinele tisulare. Este deci avantajos pentru organism dacă rata de catabolizare a proteinelor tisulare este redusă, în cazul unei ingeste proteice scăzute.

Rezultatele referitoare la influența calității materialului azotat arată existența unor diferențe importante. Atît concentrația în proteine și ADN, cît și activitatea SD, fosfatazei acide și alcaline, sînt mai crescute la animalele care au primit dieta maidică. Între acești indici există însă o deosebire esențială : în timp ce fosfataza acidă și cea alcalină prezintă o evoluție corespunzătoare cu greutatea corporală, conținutul în proteine, ADN și activitatea SD cresc mai mult decît greutatea corporală.

Aceste date sînt în concordanță atît cu concluziile noastre anterioare [5] cît și cu acelea ale lui Umana [12], care, experimentînd ca și noi pe șobolani, a găsit că regimul cu zeină (5 g%) a mărit concentrația ADN din ficat. În ultimul deceniu au existat multe controverse referitoare la constanța conținutului de ADN din nucleii celulelor hepatice, în condiții de malnutriție proteică. În timp ce unii autori nu au constatat o creștere a concentrației de ADN după o administrare a unor diete sărace în azot (sau proteine), alți autori [14] au găsit o creștere în cazul regimurilor hipoproteice.

Activitatea GOT este mai scăzută la animalele care au primit dieta maidică, evoluția enzimei mergînd în paralel cu evoluția greutății corporale. O altă caracteristică observată la animalele care au primit dieta maidică constă în faptul că diferențele se instalează treptat și cu timpul se accentuează (față de regimul cu cazeină) pentru toate enzimele studiate.

Aceste date pun problema procesului de adaptare, care la dieta maidică, cu timpul evoluează mai accentuat spre dezechilibru. Pentru a putea aprecia mai exact modificările biochimice produse de alimentația strict maidică, ar trebui să se urmărească în ce măsură dezechilibrul realizat este ireversibil. Aceasta s-ar putea stabili prin cercetarea capacității de restabilire a organismului după instituirea unei diete complete și echilibrate, ceea ce constituie obiectul unei lucrări în curs de efectuare.

CONCLUZII

1. — Administrarea timp de 5 săptămîni, la șobolani albi în creștere, a unor regimuri normoproteic și hipoproteic pe bază de cazeină nu a produs modificări semnificative în timp, în concentrația proteinelor totale și a ADN și în activitățile SD, GOT, fosfatazei acide și alcaline din ficat.

2. — La lotul care a primit regimul hipoproteic, conținutul în proteine totale, activitatea SD și GOT au fost în toată perioada experimentală mai scăzute față de lotul cu regim normoproteic, în timp ce activitatea fosfatazei alcaline a fost mai crescută.

3. — Regimul hipoproteic pe bază de cazeină a permis o dezvoltare echilibrată, însă la un nivel mai scăzut decît cel normoproteic.

4. — La regimul maidic s-au înregistrat valori mai crescute ale proteinelor hepatice, ADN și activităților SD, fosfatazei acide și alcaline, comparativ cu regimul hipoproteic pe bază de cazeină, în timp ce activitatea GOT prezintă valori mai scăzute.

Prezentată la redacție la 12 august 1966

Secția de igiena alimentației
Institutul de igienă, București

BIBLIOGRAFIE

1. Editorial, *Protein intake and liver enzyme activity*, Nutr. Revs., **20**, 9, 280 (1962).
2. Editorial, *Effect of varying levels of dietary protein on synthesis and excretion of urea*, Nutr. Revs., **21**, 2, 54 (1963).
3. Editorial, *The effect of high protein diets on the urea cycle in rats*, Nutr. Revs., **22**, 9, 280 (1964).

4. Editorial, *The effect of diet on rat liver enzymes*, Nutr. Revs., **23**, *2*, 47 (1965).
5. Dinu I., *Influența cantității și calității proteinelor asupra activității unor enzime din ficat*, St. cerc. Biochim., **8**, *4*, 441 (1965).
6. Dinu I., *Influența suplimentării mălaiului cu vitamine și aminoacizi asupra activității unor enzime din ficat*, St. cerc. Biochim.,**9** , *1*, 25 (1966).
7. Harper A. E., *Effect of variations in protein intake on enzymes of amino acid metabolism*, Can. J. Biochem., **43**, *9*, 1589 (1965).
8. Mezincescu M. D., Popescu-Ștefănescu A., *Méthode pour l'étude des variations contingentes du besoin azoté*, Arch. Sci. Physiol., **16**, *3*, 245 (1962).
9. Muramatsu K., Ashida K., *Effect of dietary protein level on growth and liver enzyme activities of rats*, J. Nutr., **76**, *2*, 143 (1962).
10. Ross H. M., Batt W. G., *Alkaline phosphatase activity and diet*, J. Nutr., **60**, *1*, 137 (1956).
11. Schimke R., *Adaptative characteristics of urea cycle enzymes in the rat*, J. Biol. Chem., **237**, *2*, 459 (1962).
12. Umana R., *Effect of protein malnutrition on the deoxyribonucleic acid content of rat liver*, J. Nutr., **85**, *2*, 169 (1965).
13. Waldorf M., Kirk M. C., Linkswiller H., Harper, A. E., *Metabolic adaptations in higher animals. VII. Responses of glutamate-oxaloacetate and glutamate-pyruvate transaminases to diet*, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **112**, *3*, 746 (1963).
14. Williams J. N., *Response of the liver to prolonged protein depletion. I. Liver, weight, nitrogen and deoxyribonucleic acid*, J. Nutr., **73**, *3*, 199 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 129 – 133 (1967)

DETERMINAREA GREUTĂȚII MOLECULARE A LANȚURILOR POLIPEPTIDICE L ȘI H DIN MOLECULA DE IgG DE IEPURE PRIN CROMATOGRAFIE ÎN STRAT SUBȚIRE PE GEL DE SEPHADEX G-200

CORINA DRAGOMIRESCU

576.8

Rezumat. — Separarea lanțurilor polipeptidice din molecula Ig de iepure a fost realizată prin cromatografia în strat subțire pe gel de Sephadex G-200 superfin. Determinarea greutății moleculare a lanțurilor L și H prin cromatografie în strat subțire a dus la valori de 25 200—27 000 pentru lanțul L și de 50 200—52 500 pentru lanțul H. Aceste valori sînt în concordanță cu datele din literatură.

Folosirea pe scară largă a gel-filtrării ca metodă de evaluare a greutății moleculare a substanțelor proteice [1], [2], [3] a fost determinată de apariția și capacitatea de filtrare moleculară a gelurilor de dextran legate încrucișat, a Sephadex-ilor de tip G, de diferite porozități (pentru domenii largi de dimensiuni moleculare), cu eficiență optimă pentru obținerea unei relații lineare între volumul de eluție al fiecărei substanțe și logaritmul greutății lor moleculare [1].

Cînd cromatografia în strat subțire a luat o mare amploare în urma standardizării ei de către Stahl [4], avantajele gel-filtrării au fost coroborate cu cele ale cromatografiei în strat subțire, în vederea obținerii unei ultramicrometode rapide [5], [6] cu multiple aplicații în biochimia proteinelor, dintre care determinarea greutății moleculare reprezintă numai un aspect [7].

Determinarea greutății moleculare a IgG și a lanțurilor polipeptidice L și H a fost realizată pînă în prezent prin ultracentrifugare (vezi tabela). Deoarece această metodă necesită o cantitate destul de mare de proteină, ea nu poate fi aplicată la determinarea greutății moleculare a unor substanțe care se obțin în cantități mici, cum este cazul anticorpilor sintetizați în ganglionii limfatici. De aceea, lucrarea de față își propune să verifice dacă prin cromatografie în strat subțire pe gel de Sephadex (care nu necesită decît cîteva micrograme de substanță proteică), se pot obține valori ale greutății moleculare comparabile cu cele găsite prin ultracentrifugare, rămînînd ca într-o etapă ulterioară această metodă să fie aplicată la determinarea greutății moleculare a anticorpilor și a anțurilor polipeptidice din diferite țesuturi anticorpoformatoare.

MATERIALE ŞI METODE

Stabilirea curbei etalon s-a făcut cu ajutorul unor proteine pure, cu greutate moleculară cunoscută. S-au folosit următoarele proteine :

- lizozim GM = 14 500 [7] NBC.
- pepsina GM = 35 000 [7] Serva (cristalizată, pură)
- albumina serică bovină GM = 65 000 [7] NBC.
- IgG de iepure GM = 150 000 [8], purificată prin cromatografie pe DEAE-celuloză [9]
- hemoglobină GM = 68 000 [7] Mann Research Laboratories (substrat liofilizat).

Ca mediu suport s-a folosit Sephadex G-200 superfin Pharmacia Uppsala, Suedia, iar ca agent de irigare a fost utilizată o soluţie de NaCl 0,5 M [7].

Lanţurile H şi L s-au obţinut din IgG de iepure prin reducere cu tioglicolat de sodiu 0,1 M, pH 8,2 şi filtrare prin gel de Sephadex G-100, folosind ca eluant o soluţie N de acid acetic [9]. Puritatea lanţurilor a fost demonstrată prin imunoelectroforeză cu ajutorul unui ser de măgar anti-IgG de iepure [9].

Condiţiile de lucru au fost următoarele : s-au suspendat 3 g de Sephadex G-200 superfin în 75 ml soluţie NaCl 0,5 M [7] şi s-au lăsat la îmbibat 72 de ore. Gelul obţinut în acest fel s-a întins pe o placă de 15×20 cm cu ajutorul unui stratificator special, realizat în laboratorul nostru, cu care se obţine o grosime de strat de 0,5 mm [6], [7], [10]. Placa s-a pus la echilibrat în poziţie orizontală, într-o cameră umedă, unde s-a lăsat peste noapte. Acest proces de preechilibrare a fost necesar pentru obţinerea unor rezultate reproductibile [7]. A doua zi s-au aplicat pe placă, cu ajutorul unei micropipete, cantităţi de 1—20 μg proteină, conţinute într-un volum de 0,5—1,0 μl, la o distanţă de 3 cm de marginea superioară a plăcii [7]. Contactul la capete s-a realizat cu benzi de hîrtie Whatman 3 MM, aşezate pe distanţa de 1,5 cm pe suprafaţa gelului, iar ca agent de irigare s-a folosit soluţia de NaCl 0,5 M. Unghiul pe care-l face placa cu tancul care conţine solventul a fost de 20°. Măsurarea vitezei de curgere a solventului s-a realizat folosind ca substanţă colorată de referinţă hemoglobina [6]. Pentru a uşura aplicarea soluţiilor de analizat, acestea s-au colorat adăugîndu-le un cristal de albastru de brom-fenol. Developarea s-a efectuat după $5\,^1/_2$ ore de migrare. În acest scop, placa s-a aşezat în poziţie orizontală şi s-a acoperit cu hîrtie de filtru Whatman 3 MM, umezită cu solvent (pentru evitarea bulelor, hîrtia s-a aşezat cu partea netedă în jos şi s-a rulat pe stratul de gel), începînd dinspre strat spre capătul opus. Placa acoperită în acest fel s-a uscat într-un curent de aer cald, la 90—100°, timp de 30—45 min.

Punerea în evidenţă a proteinelor s-a făcut prin colorare cu o soluţie saturată de verde-lumină în acid acetic 5 %, timp de o oră, şi spălare cu acid acetic 5 % [10]. În urma spălărilor repetate, hîrtia se desprinde de pe placă şi pe ea apar spoturi colorate. Colorarea s-a făcut şi cu o soluţie de albastru de brom-fenol (colorant 0,1 g, clorură mercurică 5 g, acid acetic glacial 10 ml, etanol 96 % 90 ml). Durata de colorare a fost de 45 min, iar spălarea s-a făcut cu acid acetic 2 %.

După uscarea hîrtiei de filtru s-au măsurat distanţele de migrare ale proteinelor testate faţă de proteina de referinţă (hemoglobina). Ca puncte de reper faţă de start au fost luate atît marginea superioară, cît şi marginea inferioară a spoturilor ; s-a făcut media faţă de care s-au efectuat apoi calculele. S-au obţinut în acest fel valorile R_{Hb} pentru fiecare proteină în parte :

$$R_{Hb} = d_p/d_{Hb}$$

unde : d_p = distanţa de migrare a substanţei testate (în mm)
d_{Hb} = distanţa de migrare a substanţei de referinţă (în mm).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Reprezentarea grafică a datelor cromatografice (5 experiențe) dă curba etalon din figura 1.

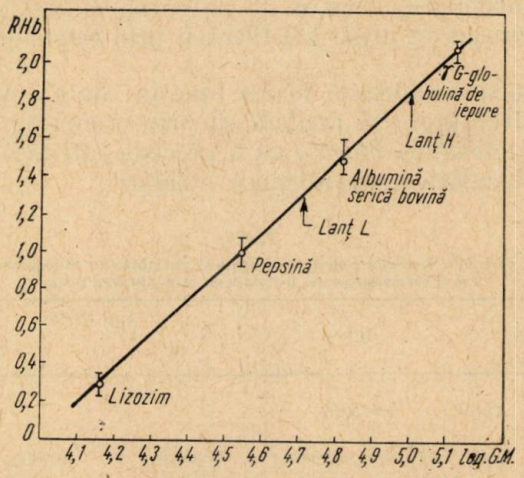


Fig. 1. — Curba etalon de corelație între R_{Hb} și log G. M. a unor substanțe proteice

Confruntarea rezultatelor obținute în cele 5 experiențe și calcularea abaterilor standard au arătat că, prin această metodă, se poate lucra cu o precizie de aproximativ $\pm$ 10 %, așa cum menționează și Andrews [2] pentru cromatografia în coloană.

Determinarea greutății moleculare a lanțurilor L și H din molecula IgG de iepure s-a făcut după separarea prealabilă prin gel-filtrare a acestor lanțuri. S-au obținut cromatograme reprezentate schematic în figura 2.

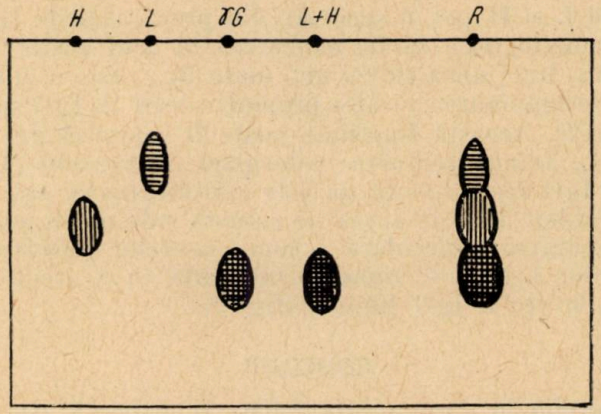


Fig. 2. — Separarea prin cromatografie în strat subțire a lanțurilor polipeptidice L și H.

H = lanț H; *L* = lanț L; *γG* = IgG intactă; *R* = IgG redusă; *L* + *H* = amestec de lanțuri L și H.

Cromatografia pentru H, L, γ G și L + H a fost efectuată în NaCl 0,5 M. Pentru R în acid acetic N.

Calcularea greutății moleculare pentru lanțurile L și H a condus la valori de 25 200—27 000 pentru lanțul L și de 50 200—52 500 pentru lanțul H.

Aceste date au fost calculate luîndu-se valoarea pe jumătate a log. greutății moleculare, obținut de pe curba etalon, știind că lanțurile L și H se dimerizează în urma gel-filtrării prin Sephadex G—100 în acid acetic N [11].

Rezultatele se încadrează foarte bine în datele din literatură (vezi tabela) și ne îndreptățesc să credem că prin cromatografia în strat subțire vom putea determina corect, cu o precizie satisfăcătoare, compoziția și greutatea moleculară a anticorpilor celulari.

Tabela

Greutățile moleculare ale IgG de iepure și ale lanțurilor polipeptidice L și H corespunzătoare, determinate prin ultracentrifugare

Autorul și anul	IgG	Lanțurile		Indicația bibliografică
		H	L	
R. R. PORTER 1959	187 600	—	—	14
J. B. FLEISCHMAN și colab. 1962	140 000—150 000	110 000 (55 000)	40 000—50 000 (20 000)	11
P. A. SMALL și colab. 1963	170 000	55 000	25 000	15
R. H. PAIN 1963	140 000	50 000	20 000	16
E. MARLER și colab. 1964	150 000	50 000	25 000	8
M. E. NOELKEN și colab. 1965	145 000	—	—	17
Valorile noastre obținute prin cromatografie în strat subțire 1966	—	50 200—52 500	25 200—27 000	—

Lanțurile L și H pot fi separate din preparatul de IgG redusă, cu condiția ca cromatografia să fie executată în acid acetic N (fig. 2). În amestecul redus, fracțiunea cu cel mai mare R_{Hb} este o moleculă de IgG rezultată din recombinarea în alte proporții decît în IgG nativă a lanțurilor L și H [12]. Această fracțiune poate fi compusă din două lanțuri H și un lanț L, avînd greutatea moleculară de 122 000 [12]. Separarea lanțului H de IgG recombinată nu este satisfăcătoare, așa cum de altfel a arătat și Winkler [13], de aceea pe această cale nu se poate determina satisfăcător greutatea moleculară a componentelor separate. Prin amestecarea lanțurilor L și H se reface o moleculă cu o greutate moleculară asemănătoare cu cea a IgG intacte (fig. 2).

CONCLUZII

Cromatografia în strat subțire poate fi utilizată atît în scopul separării lanțurilor polipeptidice L și H care alcătuiesc molecula de IgG, cît și pentru determinarea, cu o precizie satisfăcătoare a greutății lor moleculare.

Prezentată la redacție la 30 noiembrie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București.

BIBLIOGRAFIE

1. WHITAKER J. R., *Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex*, Anal. Chem., **35**, 1950 (1963).
2. ANDREWS P., *Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration*, Biochem. J., **91**, 222 (1964).
3. ANDREWS P., *The gel filtration of proteins related to their molecular weights over a wide range*, Biochem. J., **96**, 595 (1965).
4. STAHL E., *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, 1962.
5. DETERMANN H., *New applications of thin-layer chromatography. I. Chromatography on dextran gels*, Experientia, **18**, 430 (1962).
6. JOHANSSON B. G., RYMO L., *Thin-layer gel filtration*, Acta Chem. Scand., **16**, 2067 (1962).
7. MORRIS C.J.O.R., *Thin layer chromatography on Sephadex G-100 and G-200*, J. Chromatog., **16**, 167 (1964).
8. MARLER E., NELSON CH. A., TANFORD CH., *The polypeptide chains of rabbit γ-globulin and its papain cleaved fragments*, Biochemistry, **3**, 279 (1964).
9. MIHĂESCU S., *Distribution of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonic acid in the polypeptide chains of rabbit γG-globulin*, Rev. roum. biochim., **4**, 101, (1967).
10. JOHANSSON B. G., RYMO L., *Separation of proteins by thin layer gel filtration*, Acta Chem. Scand.,**18** , 217 (1964).
11. FLEISCHMAN J. B., PAIN R. H., PORTER R. R., *Reduction of γ-globulins*, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 174 (1962).
12. FRANĚK F., *On proteins. C.I. Study of the polypeptide chain arrangement in pig γ-globulin through molecular and peptide map characteristics of individual polypeptide chains and higher sub-units*, Collection Czechoslov. Chem. Commun., **31**, 1142 (1966).
13. WINKLER M. H., GOLDMAN M. B., SWEENEY E. A., *Fluorescence depolarization. II. The intramolecular relationships of the constituent fragments of γ-globulin*, Biochim. Biophys. Acta, **112**, 559 (1966).
14. PORTER R. R., *The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain*, Biochem. J., **73**, 119 (1959).
15. SMALL P. A., KEHN J. E., LAMM M. E., *Polypeptide chains of rabbit gamma-globulin*, Science, **142**, 393 (1963).
16. NOELKEN M. E., NELSON C. A., BUCKLEY C. E., III, TANFORD C., *Gross conformation of rabbit 7S γ-immunoglobulin and its papain-cleaved fragments*, J. Biol. Chem., **240**, 218 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 135 – 136 (1967)

ENERGIA DE ACTIVARE A REACȚIILOR CATALIZATE DE FOSFATAZA ȘI APIRAZA DIN FRUNZELE DE TUTUN ATACATE DE VIRUSUL MOZAICULUI TUTUNULUI ȘI DE CIUPERCA „ERYSIPHE CICHORACEARUM" DC

V. EȘANU

577.12

Rezumat. — Starea de boală duce la scăderea calității enzimelor, ceea ce se reflectă prin reducerea capacității de restabilire a funcțiilor metabolice dereglate de prezența parazitului.

În studiul relațiilor ce se stabilesc între paraziți și plantele-gazdă, o atenție deosebită s-a acordat variațiilor în activitatea enzimatică. Cercetările în această direcție sînt foarte numeroase și au adus un aport important la cunoașterea mecanismelor de reacție a celulelor și organismelor atacate. Totuși, aspectele modificărilor calitative ale enzimelor țesuturilor atacate, ca oglindire mai subtilă a mecanismelor reacțiilor gazdei, practic, nu s-au cercetat. Unul din criteriile ce pot fi folosite în acest scop este coeficientul energiei de activare. Se consideră că enzima este de o calitate cu atît mai ridicată, cu cît reduce mai mult energia de activare a reacției catalizate de către ea. În încercarea de a caracteriza proprietatea de rezistență a soiurilor unor plante la atacul unor agenți patogeni, s-a arătat că la soiurile rezistente valoarea energiei de activare este mai mică decît la cele sensibile [1], [3]. Cît privește, însă, variația valorii acestui coeficient în cazul interacțiunii cu parazitul, ne este cunoscută numai lucrarea lui O.N. Granitova (citat după [1]), care a găsit, la bumbacul atacat de *Verticillium dahliae* Klebahn., o scădere a energiei de activare a hidrolizei amidonului de către amilază, în special în tulpină.

În lucrarea de față ne-am propus să studiem variația energiei de activare a reacțiilor catalizate de fosfataza și aspiraza din frunzele de *N. tabacum*, soiul Ghimpați, atît sănătoase cît și atacate fie de un virus — virusul mozaicului tutunului (VMT), fie de o ciupercă *Erysiphe cichoracearum*.

Plantele au fost infectate experimental în stadiul de 6—7 frunze. În cazul VMT, infecția s-a efectuat prin frecarea frunzei a 2-a cu suc provenit de la plante bolnave; martorii au fost tratați identic, dar cu suc provenit de la plante sănătoase. Probele au fost prelevate imediat după apariția simptomelor. În cazul ciupercii, s-au infectat jumătăți de frunză, prin aplicarea unor picături de suspensie de conidii. Probele au fost luate la 6—7 zile după apariția fructifi-

cațiilor. În acest caz s-au analizat atît jumătățile infectate ale frunzelor, în comparație cu material analog provenit de la plante sănătoase, cît și jumătățile neinfectate ale plantelor infectate.

Activitatea fosfatazică s-a determinat la pH 5,0 (tampon medinal-acetat-HCl) folosindu-se ca substrat β-glicerofosfat de sodiu. Activitatea apirazică s-a determinat la pH 6,5, după metoda indicată de Kotelnikova [2]. Energia de activare s-a calculat după relația lui Arrhenius : $\mu = R \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \ln Q_T$, în care $Q_T = \frac{k_2}{k_1}$; k_1 este viteza de reacție corespunzătoare temperaturii T_1 (293°K), iar k_2 cea corespunzătoare temperaturii T_2 (303°K).

Din tabela 1 se observă că, atît în cazul infecției cu un virus, cît și în cel al infecției cu o ciupercă, se înregistrează creșteri nete ale valorilor coeficientului termic (Q) și coeficientului energiei de activare (μ).

Tabela 1

Variația coeficientului termic (Q) și al energiei de activare (μ) a reacțiilor catalizate de fosfataza și apiraza frunzelor de tutun sănătoase și infectate cu VMT și Erysiphe cichoracearum DC (valori medii de la 3–5 determinări)

Frunza	VMT				*E. cichoracearum DC*			
	Fosfataza		Apiraza		Fosfataza		Apiraza	
	Q_T	μ	Q_T	μ	Q_T	μ	Q_T	μ
*S**	1,75	9629	1,67	8863	1,18	2590	1,23	3288
B	2,03	12228	2,46	15803	1,31	4245	1,62	7751
SB	—	—	—	—	1,26	3806	1,40	5432

* *S* = frunze sănătoase de la plante sănătoase; *B* = frunze bolnave de la plante bolnave; *SB* = frunze sănătoase de la plante bolnave.

În cazul infecției cu *E. cichoracearum*, însă, creșterea coeficientului μ s-ar putea atribui, eventual, predominării enzimelor parazitului, care ar putea fi caracterizate printr-o valoare mai mare a acestuia. Pentru a înlătura această ipoteză, am determinat valoarea coeficientului și în jumătățile lipsite de prezența directă a ciupercii, din frunzele infectate experimental. Și în acest caz se determină o valoare superioară celei din țesuturile sănătoase. Deci, variația lui μ este urmarea unor modificări mai profunde în metabolismul țesuturilor atacate, care se manifestă chiar în lipsa organelor ciupercii și la distanță de acestea.

Reiese, deci, că unul din efectele caracteristice stării de boală, indiferent de tipul de agent patogen, îl constituie scăderea calității enzimelor, ceea ce provoacă reducerea capacității de restabilire a funcțiilor metabolice dereglate în urma prezenței parazitului.

Prezentată la redacție la 12 noiembrie 1966

Institutul de biologie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. Blagovescenschi A. N., *Bazele biochimice ale procesului de evoluție la plante*, Edit. agrosilvică de stat, București, 1953.
2. Kotelnikova A. V., D.A.N. SSSR, **78**, *5*, 578 (1951).
3. Eșanu V., Ekologia Polska, s.A., **XI**, *30*, 627 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 137 – 139 (1967)

INFLUENȚA RADIAȚIILOR IONIZANTE ASUPRA ACTIVITĂȚII ATP-AZEI DIN CREIERUL DE ȘOARECE

EUGENIA GHIZARI

577.12

Rezumat. — S-a urmărit variația ATP-azei din creieri de șoarece la diferite doze de raze X, între 12,5 și 500 *r*, la 1, 24 și 48 de ore după iradiere. S-a constatat că, la doze mari de raze X (500, 250 și 125 *r*) activitatea enzimei studiate prezintă o scădere după 24 și 48 de ore. În cazul dozelor mici (12, 25 și 50 *r*), activitatea enzimei este puțin afectată atît după 24 cît și după 48 de ore.

Nici dozele mari de raze X, nici cele mici nu produc modificări sesizabile după un interval de o oră de la iradiere.

Efectul dăunător al radiațiilor ionizante în celule a fost semnalat, aproape în același timp cu razele X și radioactivitatea, la sfîrșitul secolului trecut [7], [9]. Acest efect dăunător se exercită în special asupra elementelor cele mai labile de la nivelul celulei — sistemele enzimatice [1], [2], [5], [8], [10].

Într-o lucrare anterioară [3] am arătat efectul radiațiilor asupra PP-azei anorganice din creier. În continuarea cercetărilor noastre, am urmărit acțiunea radiațiilor ionizante asupra unui alt sistem enzimatic, ATP-aza din creierul de șoarece.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-a lucrat pe șoareci albi în greutate de 20—30 g, de ambe sexe, împărțiți în 7 loturi de cîte 10 animale: lotul I — animale de control; lotul II — animale iradiate cu 500 *r*; lotul III — animale iradiate cu 250 *r*; lotul IV — animale iradiate cu 125 *r*; lotul V — animale iradiate cu 50 *r*; lotul VI — animale iradiate cu 25 *r*; lotul VII — animale iradiate cu 12,5 *r*.

La toate cele 7 loturi s-a determinat activitatea enzimatică la 1, 24 și 48 de ore de la iradiere, în paralel cu animalele de control (lotul I).

S-a determinat activitatea ATP-azei din omogenatul de creier făcut în ser fiziologic după metoda W. Vayne Kielley (citat după [4]), în tampon acetat pH 7,8. Cantitatea de fosfat pusă în libertate prin formarea complexului fosfomolibdenic care ulterior se reduce cu metol la Mo^{3+} albastru se apreciază după Fische. Culoarea se citește la spectrofotometru, la 578 mμ.

REZULTATE

Urmărind variațiile enzimei la 1, 24 și 48 de ore de la iradiere, se constată următoarele (tabela 1) :

Atît la doze mari (500, 250, 125 *r*) cît și la doze mici (12, 25 și 5 *r*) nu se observă scăderi în activitatea ATP-azei la un interval de o oră de la iradiere (4,50—4,60 μmoli, față de 4,80 μmoli la animalele de control).

După 24 de ore încep însă să apară modificări semnificative. La 500 *r*, valoarea enzimei scade simțitor, ajungînd la 3,25 μmoli față de 4,80 μmoli, deci cu 33 %. Scăderea continuă să se accentueze ajungînd la 48 de ore la 2,70 μmoli (42 %).

La doze mai mici de raze X, scăderile valorilor activității ATP-azei sînt mai reduse. La 250 *r*, scăderea după 24 de ore este de numai 23 %, iar după 48 de ore de 33 %. La 125 *r*, după un interval de 24 de ore activitatea enzimei scade cu 17 %, iar după 48 de ore numai cu 21 %.

În cazul dozelor și mai mici de raze X (50, 25 și 12 *r*), atît la 24 cît și la 48 de ore scăderile observate în activitatea ATP-azei sînt mici, în medie de 10 %, ceea ce arată că la aceste doze radiațiile ionizante nu au efect inhibitor important asupra sistemului enzimatic urmărit de noi.

Tabela 1

Variațiile activității ATP-azei din creierul de șoarece la diferite doze de iradiere (în μM/g/min) (cifrele reprezintă valorile medii pe loturi pe de cîte 10 animale)

Doza	Martor	1 oră	24 ore	48 ore
500 *r*	4,80	4,50	3,25	2,70
250 *r*	4,82	4,58	3,75	3,14
125 *r*	4,80	4,60	3,92	3,84
50 *r*	4,70	4,60	4,50	4,13
25 *r*	4,80	4,58	4,50	4,30
12,5 *r*	4,65	4,60	4,35	4,25

DISCUȚIA REZULTATELOR

Din tabela 1 se vede o scădere a activității ATP-azei din creierul animalelor iradiate cu 125, 250 și 500 *r*. La 24 de ore după iradiere se constată o scădere care se accentuează la 48 de ore. Inhibiția enzimei variază în funcție de doza de raze X administrată animalelor. Astfel, la doza de 500 *r*, după 48 de ore se obține cea mai scăzută valoare a activității ATP-azei. Pe măsură ce doza de raze X aplicată animalelor descrește, activitatea enzimei rămîne mai aproape de valoarea normală. Astfel se demonstrează că perturbarea produsă în sistemul enzimatic urmărit de noi este aproximativ paralelă cu doza de radiații administrată în cazul dozelor mici.

Acest lucru se datorește probabil atît acțiunii directe asupra părții proteice din enzimă cît și acțiunii indirecte a radiațiilor ionizante asupra enzimelor, prin radicalii liberi formați ($HO^{\cdot}$; $HO_2^{\cdot}$; H_2O_2) în soluții apoase, lucru arătat de Dale [6].

Dacă ne referim însă la variațiile de activitate a enzimei în cadrul animalelor iradiate cu doze mici de 12, 25 și 50 *r*, se constată că fluctuațiile

care apar în intervalul de timp urmărit de noi sînt mici, ajungînd în cazul tuturor dozelor mai sus amintite la valori apropiate de cele ale martorilor după 48 de ore de la iradiere. Efectul dozelor mici de 12, 25 și 50 *r* apare în determinările noastre ca un proces mai greu de surprins. Este posibil ca în cazul de față cantitatea de energie transportată în sistem să fie la limita dintre pragul de inhibiție și cel de excitație a enzimelor studiate.

CONCLUZII

1. Dozele mari de raze X (500, 250 și 125 *r*) produc o scădere a activității enzimatice a ATP-azei după 24 și 48 de ore de la iradiere.

2. Dozele mici de raze X (12, 25 și 50 *r*) afectează într-o măsură mai mică acțiunea ATP-azei, la 24 și 48 de ore de la iradiere.

3. Atît dozele mari cît și dozele mici de raze X nu modifică sesizabil activitatea enzimei la o oră de la iradiere.

Prezentată la redacție la 22 iulie 1966

Institutul de fiziologie normală și patologică „D. Danielopolu" al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. Butler I.A.V., *Effects of X rays and radiomimetic agents on nucleic acids and nucleoproteins*, în *Ciba Foundations Symposion on Ionizing Radiation and Cell Metabolism*, Edit. Churchill, London, 1956, p. 59.
2. Căpâlnă S., *Aspecte din protecția împotriva particolelor radioactive*, Fiziol. norm. și patol., **8**, 79 (1962).
3. Căpâlnă S., Ștefan M., Ghizari E., *Efectul radioprotector al glicinei în timpul iradierii cu raze X*, Fiziol. norm. și patol., **12**, 263 (1966).
4. Collowik S., Kaplan N., *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1955.
5. Dale W. M., *The effects of ionizing radiations on enzymes in vitro*, în *Ciba Foundation Symposion on Ionizing Radiation and Cell Metabolism*, Edit. Churchill, London, 1956, p. 25.
6. Dale W M., *The effects of X rays on enzymes*, Biochem. J., **34**, 1367 (1940).
7. Dendy P P., *Recent advances in the micro-irradiation of cell*, Nature, **211**, 17 (1966).
8. Errera M., *Effects of Radiations on Cell*, în *The Cell*, sub redacția J. Brachet, Academic Press, New York and London, 1959, vol. I, p. 695.
9. Jamieson D., *Ionizing radiation and the intracellular oxidation-reduction state*, Nature, **209**, 361 (1966).
10. Setlow R. B., Pollard E. C., *Molecular Biophysics*, Edit. Pergamon, London, 1962.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 141 – 144 (1967)

ACȚIUNEA INHIBITORIE A ARABINOZEI ASUPRA ACTIVITĂȚII TRIPSINEI

M. KEREKES, EUGENIA GOIAN, A. KOVACS și A. TOTH

577.156.3

Rezumat. — S-a studiat acțiunea D- și L-arabinozei, în diferite concentrații, asupra activității tripsinei, determinată pe substrat de azocaseină. Ambii antipozi inhibă în măsură practic egală activitatea tripsinei, inhibiția fiind direct proporțională cu concentrația arabinozelor. Investigarea relației dintre acțiunea inhibitoare și viscozitatea soluțiilor de arabinoză, a arătat că, pînă la concentrația de 0,8 M, inhibiția este direct proporțională cu incrementul de viscozitate produs de prezența arabinozei.

Glucidele exercită o acțiune inhibitorie asupra activității tripsinei. Astfel, Farber și Wynne [1] au observat că unele monozaharide inhibă activitatea proteinazelor pancreatice, iar Kerekes și Furda [2] au demonstrat că glucoza reduce considerabil activitatea tripsinei, scăderea activității fiind proporțională cu concentrația glucozei. Ne-am propus să studiem mai aprofundat acest fenomen, în vederea obținerii unor date mai precise asupra mecanismului său.

Am determinat activitatea tripsinei pe substrat de azocaseină, preparată după Charney și Tomarelli [3], cu unele modificări [2]. Amestecul de reacție a conținut 0,1 mg/ml tripsină (B. D.H.) și 12,5 mg/ml azocaseină, dizolvate în tampon fosfat 0,066 M, cu pH 7,5, precum și D- sau L-arabinoză în cantitățile indicate mai jos. Soluția s-a incubat timp de 10 min la 37°C. După adăugarea de acid tricloracetic, filtrare și alcalinizare cu NaOH, s-a citit extincția la fotometrul Pulfrich, cu filtrul S 42, în cuva de 1 cm. Martorii s-au lucrat în mod identic, fără incubație. Scăzînd din valorile extincțiilor valorile martorilor, am exprimat activitatea enzimatică în miligrame de azocaseină hidrolizată în condițiile descrise. Activitățile obținute în prezența arabinozei au fost raportate la cea fără arabinoză, aceasta fiind considerată 1.

Rezultatele au dovedit că, în mod practic nu există diferență între acțiunea inhibitorie a D- și L- arabinozei. În condițiile descrise, acțiunea inhibitorie este practic direct proporțională cu concentrația arabinozei (fig. 1).

În continuare am studiat relația dintre acțiunea inhibitorie a soluțiilor de arabinoză și vîscozitatea lor. Pentru acest scop am determinat

cu ajutorul vîscozimetrului Ostwald vîscozităţile soluţiilor de arabinoză în prezenţa azocaseinei, la 37° C. Am renunţat la adăugarea tripsinei, întrucît, dată fiind cantitatea sa redusă, ea nu influenţează în mod prac-

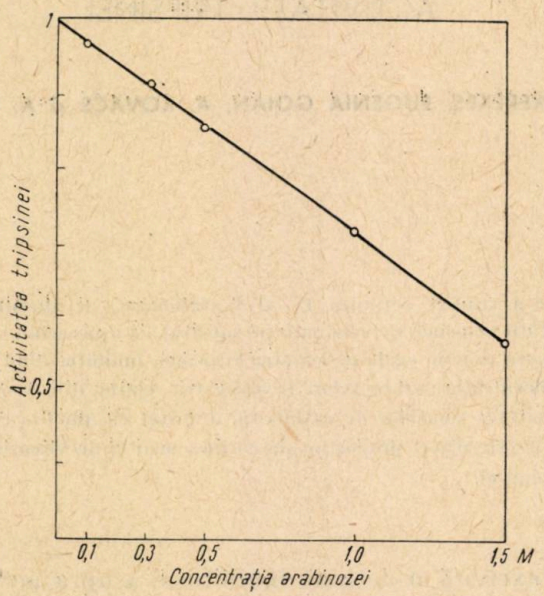


Fig. 1. — *Acţiunea inhibitorie a D- şi L-arabinozei asupra activităţii tripsinei.*
Amestecul de reacţie a conţinut 12,5 mg/ml azocaseină, 0,1 mg/ml tripsină şi D- sau L-arabinoză în tampon fosfat (0,066 M, pH 7,5). Timpul de incubaţie 10 min la 37°C.

tic vîscozitatea soluţiei, ci ar duce chiar la rezultate eronate prin hidroliza azocaseinei, care ar interveni în cursul determinării.

Din timpii de scurgere am calculat viscozităţile specifice, după formula :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{soluţie} - \eta_{solvent}}{\eta_{solvent}} = \eta_{rel} - 1$$

Scăzînd vîscozitatea specifică a solventului (inclusiv azocaseina) din cea a probelor cu arabinoză, am obţinut incrementul de vîscozitate produs de arabinoză.

Datele obţinute cu cei doi antipozi au fost identice. Din figura 2 se observă că, pînă la concentraţia de 0,8 M, proporţionalitatea dintre vîscozitate şi concentraţie este directă. Peste această concentraţie vîscozitatea creşte vertiginos.

Figura 3 reprezintă relaţia dintre incrementul de vîscozitate produs de arabinoze şi acţiunea lor inhibitorie. Pînă la concentraţia de 0,8 M

corelaţia se exprimă printr-o dreaptă, corespunzînd ecuaţiei: *activitate* $= 1 - 0{,}84\ \eta_{sp}$; cum însă *activitate* = 1 — inhibiţie, urmează că *inhibiţie* $= 0{,}84\ \eta_{sp}$

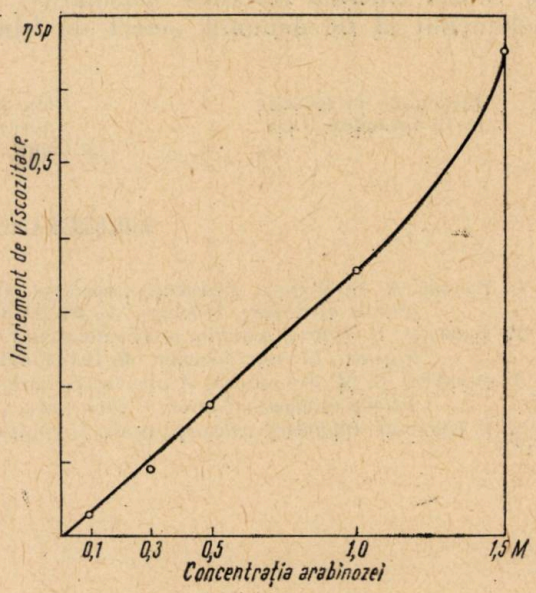


Fig. 2. — *Incrementul de viscozitate, produs de adăugarea D- sau L-arabinozei la sistemul substrat-enzimă.*

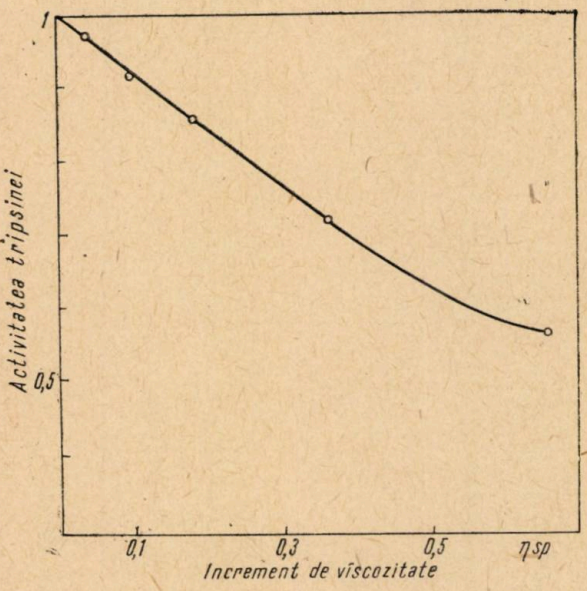


Fig. 3. — *Corelaţia dintre acţiunea inhibitorie a D- şi L-arabinozei asupra activităţii tripsinei şi incrementul de viscozitate al soluţiei.*

În consecinţă, inhibiţia tripsinei de către arabinoză este direct proporţională cu incrementul de vîscozitate produs de aceasta, pînă la concentraţia arabinozei de 0,8 M.

Acest efect se datoreşte în primul rînd faptului că moleculele arabinozei formează o piedică în calea moleculelor substratului şi ale enzimei. Acest fel de inhibiţie diferă esenţial de toate celelalte tipuri discutate în cadrul cineticii reacţiilor enzimatice. De fapt, ar fi mai potrivit ca fenomenul să fie denumit „efect de frînare nespecific" [4].

Prezentată la redacţie
la 18 octombrie 1966

*Baza de cercetări ştiinţifice Tîrgu Mureş
a Academiei Republicii Socialiste România
şi Catedra de biochimie, I.M.F., Tîrgu Mureş*

BIBLIOGRAFIE

1. L. Farber, A. M. Wynne, *Pancreatic proteinase. II. The effect of various compounds on the activity of enzyme*, Biochem. J., **29**, 2323 (1935).
2. M. Kerekes, P. Furda, *Acţiunea protectoare a unor glucide asupra denaturării prin căldură a tripsinei*, St. cerc. biochim., **8**, 199 (1765).
3. J. Charney, R. M. Tomarelli, *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*, J. Biol. Chem., **171**, 501 (1947).
4. M. F. Kerekes, *Inhibitory action of glucides on trypsin activity*, Nature, **210**, 633 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 145 – 149 (1967)

ACȚIUNEA FACTORULUI LIPOTROP PANCREATIC ASUPRA HIPERLIPEMIEI ȘI HIPERCOLESTEROLEMIEI EXPERIMENTALE

I. A. MOLNAR, M. SIMIONOVICI, EUGENIA TUCICOV, C. M. GEORGESCU și JANETTE WINTER

612.398.12

Rezumat. — S-a studiat acțiunea factorului lipotrop pancreatic (FLP) prin urmărirea modificărilor colesterolului, lipemiei totale și a densității optice plasmatice la șobolani intoxicați cu Triton A-20 (Serva). Administrarea FLP s-a efectuat intraperitoneal în doză mică de 250 mg/kg corp și per oral curativ și preventiv în 4 doze zilnice de 1 000 mg/kg corp. Acțiunea hipocolesterolemiantă și hipolipemiantă cea mai intensă s-a obținut în cazul administrării intraperitoneale, urmată de tratamentul per oral curativ, rezultatele cele mai scăzute fiind observate după tratamentul curativ.

Efectul observat este asemănător cu cel cunoscut în cazul folosirii sulfomucopolizaharidelor, însă nu poate fi atribuit acestui grup de substanțe fiindcă FLP nu le conține. Efectul observat poate servi ca test rapid pentru punerea în evidență a acțiunii hipocolesterolemiante și hipolipemiante a FLP.

Într-o lucrare anterioară [1] am studiat acțiunea factorului lipotrop pancreatic (FLP) preparat de noi după principiul metodei descrise de Bosshardt și colab. [2], cu unele modificări. Cu această ocazie am arătat că FLP determină, în cazul administrării per orale repetate, o reducere semnificativă a lipidelor totale și a lipidelor nefosforilate din ficat, în cazul steatozei experimentale provocată la câine prin pancreatectomie totală.

Arrigo și Montini [3], făcînd un studiu comparativ al factorilor lipotropi pancreatici, obținuți prin metodele de extracție descrise de diferiți autori (Dragstedt și colab., Bosshardt și colab. Entenmann și colab., Arrigo), au constatat că, în timp ce asupra steatozei hepatice a câinelui pancreatectomizat toate aceste substanțe exercită un efect protector asemănător, asupra steatozei hepatice a șobolanului provocată prin diferite metode de intoxicație (tetraclorură de carbon, fosfor, regim bogat în lipide), efectul lipotrop este diferit de la substanță la substanță.

În vederea încadrării mai precise a acțiunii lipotrope a FLP preparat de noi și pentru a stabili dacă FLP are și o acțiune hipocolesterolemiantă, am cercetat acțiunea lui asupra intoxicației experimentale provocată la șobolan cu triton, intoxicație care provoacă o creștere a colesterolemiei, lipemiei totale și densității optice a plasmei.

MATERIAL ŞI METODE

La şobolani de ambele sexe, în greutate de 300±25 g, s-a provocat o hiperlipemie experimentală prin administrare intravenoasă de Triton A-20 (Serva) (polioxietilen-para-izooctil-fenol) în doză de 500 mg/kg corp în soluţie apoasă de 25 %. Pentru urmărirea efectului FLP s-au folosit următoarele trei scheme de tratament.

1. — *Administrare intraperitoneală.* Lotul tratat a primit intraperitoneal, imediat după administrarea tritonului, o doză unică de FLP de 250 mg/kg corp. Animalele au fost menţinute în continuare timp de 18 ore la post, apoi sacrificate prin sîngerare.

2. — *Administrare per orală preventivă.* Lotul tratat a primit prin gavare timp de 4 zile cîte 1 000 mg FLP/kg corp în soluţie apoasă. Intoxicaţia cu triton s-a efectuat concomitent cu ultima administrare de FLP. Animalele au fost de asemenea ţinute la post după intoxicare şi sacrificate la 18 ore de la administrarea tritonului.

3. — *Administrarea per orală curativă.* Lotul tratat a primit prin gavare concomitent cu administrarea tritonului prima doză de 1 000 mg FLP/kg corp. Tratamentul a continuat timp de 3 zile prin administrare zilnică a unei doze unice de FLP 100 mg/kg corp. După ultima administrare, animalele au fost ţinute la post timp de 18 ore, apoi sacrificate.

La fiecare serie de experienţe s-a folosit cîte un lot martor, intoxicat cu triton şi netratat, dar ţinut în condiţii corespunzătoare cu lotul tratat şi sacrificat la acelaşi interval de timp.

De asemenea, pentru buna interpretare a rezultatelor la fiecare serie de experienţe s-au folosit şi loturi de animale normale care nu au primit nici un fel de tratament sau intoxicaţie.

Sîngele s-a recoltat pe soluţie de citrat şi a fost centrifugat. Pentru stabilirea efectului lipotrop s-a determinat în plasma şobolanilor colesterolul, lipemia totală şi densitatea optică, folosind metodele uzuale [4], [5].

Efectul protector s-a calculat din formula :

$$E = 100 - \frac{T - C}{I - C} \times 100$$

în care : E = efectul protector în procente ; T = valoarea medie a determinărilor la animalele tratate cu FLP ; C = valoarea medie la animalele normale netratate şi neintoxicate ; I = valoarea medie la animale martor intoxicate cu triton.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sînt trecute în tabela 1 *A*, *B* şi *C*. Analiza datelor experimentale arată că FLP, în administrare unică intraperitoneală, reduce semnificativ hipercolesterolemia şi hiperlipemia tritonică, dovedind astfel un efect lipotrop pe această cale de administrare. În cazul administrării per orale, acţiunea FLP este mai puţin intensă, în special în cazul tratamentului preventiv (începînd cu 3 zile înainte de intoxicaţia cu triton). În cazul administrării curative (timp de 3 zile după intoxicaţia cu triton) efectul anticolesterolemic şi antilipemic a fost considerat satisfăcător.

Aceste rezultate, ca şi cele obţinute la cîine pancreatectomizat [1], ne fac să credem că acţiunea lipotropă a FLP apare complexă, în funcţie de o serie de factori. S-ar părea că intervenţia FLP asupra metabolismului lipidic (hepatic şi seric) se exercită, în anumite condiţii, în funcţie de calea de administrare, de toxicul folosit (felul steatozei), precum şi de substratul asupra căruia acţionează.

Tabela 1

Efectul anticolesterolemic și antilipemic al FLP la șobolani intoxicați cu triton

A. *Colesterolemie*

Condiții de tratament	Nr. de animale	Tratamentul	Colesterol (mg/100 ml)	P	Efect protector (%)
Șobolani normali	44	—	58,2 ±2,2	—	—
Tratament intraperitoneal (doză unică)	24	Intoxicat cu triton	266,0±8,5	<0,01	31,7
	22	Intoxicat cu triton + FLP 250 mg/kg corp	200,0±8,8		
Tratament preventiv per oral (4 zile)	8	Intoxicat cu triton	450,0±26,0	<0,30	14,2
	8	Intoxicat cu triton + FLP 1000 mg/kg corp/zi	394,0±44,0		
Tratament curativ per oral (4 zile)	16	Intoxicat cu triton	289,0±43,0	<0,10	37,3
	21	Intoxicat cu triton + FLP 100 mg/kg corp/zi	203,0±30,0		

B. *Lipemie totală*

Condiții de tratament	Nr. de animale	Tratamentul	Lipide (mg/100 ml)	P	Efect protector %
Șobolani normali	30	—	1003±66,5	—	—
Tratament intraperitoneal (doză unică)	22	Intoxicat cu triton	4447±397	<0,01	41,1
	21	Intoxicat cu triton +FLP 250 mg/kg corp	3032±196		
Tratament preventiv per oral (4 zile)	8	Intoxicat cu triton	11985±1043	<0,01	32,4
	7	Intoxicat cu triton +FLP 1000 mg/kg corp/zi	8421±306		
Tratament curativ per oral (4 zile)	16	Intoxicat cu triton	6658±1450	<0,2	44,6
	18	Intoxicat cu triton +FLP 1000 mg/kg corp/zi	4135±820		

C. *Densitatea optică*

Condiţii de tratament	Nr. de animale	Tratamentul	Extincţie	P	Efect protector %
Şobolani normali	13	—	0,211±0,003	—	—
Tratament intraperitoneal (doză unică)	16	Intoxicat cu triton	1,010±0,170	<0,01	60,5
	13	Intoxicat cu triton +FLP 250mg/kg corp	0,520±0,070		
Tratament preventiv per oral (4 zile)	8	Intoxicat cu triton	1,330±0,110	<0,2	15,9
	8	Intoxicat cu triton +FLP 1000 mg/kg corp/zi	1,150±0,040		
Tratament curativ per oral (4 zile)	16	Intoxicat cu triton	1,110±0,100	<0,01	47,8
	18	Intoxicat cu triton +FLP 1000 mg/kg corp/zi	0,670±0,100		

Cunoscut fiind că tritonul intervine asupra metabolismului lipidic pe două căi posibile—accelerarea sintezei colesterolului din ficat şi modificarea complexelor lipoproteice serice [6], [7] — se poate presupune că, în condiţiile administrării parenterale a FLP (contact mai intim cu umoarea sanguină), acesta interferează la unul sau ambele nivele reducînd hiperlipemia tritonică. Pentru obţinerea unui efect lipotrop în cazul administrării per orale, apar necesare doze mai mari de FLP, ceea ce presupun fie o resorbţie incompletă sau o distrugere, fie o lipsă de activare a substanţei în tractul digestiv. În acest sens menţionăm că experienţele lui Bosshardt şi colab. [2] au arătat că, în lipsa metioninei din alimentaţie, FLP administrat per oral nu este activ asupra steatozei cîinelui pancreatectomizat. De asemenea, Leytes *, în experimentările sale asupra acţiunii de reducere a fosfolipidelor hepatice, constată că pentru obţinerea efectului maxim este necesar de a combina FLP cu factori lipotropi alimentari cum ar fi caseina, substanţă bogată în metionină. S-ar părea deci că FLP necesită o activare prealabilă în funcţie de diferiţi activatori existenţi în sînge sau tractul digestiv, pentru a i se conferi o acţiune lipotropă la diverse nivele.

Acţiunea antitritonică parenterală a FLP este asemănătoare ca efect cu cea descrisă de Bianchini [4] pentru sulfomucopolizaharidele acide obţinute din duoden şi intestin subţire. Întrucît şi pancreasul conţine sulfomucopolizaharide asemănătoare celor obţinute de diferiţi autori [4], [5], [8] din diverse ţesuturi ale tractului digestiv, pentru a lămuri dacă acţiunea hipocolesterolemiantă şi hipolipemiantă a FLP studiat de noi nu este datorită eventualei prezenţe a sulfomucopolizaharidelor, s-a verificat absenţa acestora prin reacţia metacromatică cu albastru de

* C. M. Leytes, Probl. endocr, i gormonoter., **1**, 71 (1955).

toluidină. Această reacție a fost găsită negativă, astfel că se poate afirma că acțiunea hipocolesterolemiantă și hipolipemiantă a FLP, asemănătoare ca efect cu cea a sulfomucopolizaharidelor, nu poate fi atribuită prezenței acestor compuși în preparatul FLP.

Cunoscînd dificultățile tehnice legate de folosirea cîinelui pancreatectomizat pentru determinarea acțiunii farmacodinamice a FLP [1], credem că efectul substanței asupra intoxicației tritonice la șobolani poate fi folosită ca test rapid pentru stabilirea acțiunii hipocolesterolemiante și hipolipemiante a FLP.

CONCLUZII

1. S-a pus în evidență acțiunea hipocolesterolemiantă și hipolipemiantă a FLP la șobolani intoxicați cu triton prin urmărirea colesterolemiei, lipemiei totale și a densității optice a serului.

2. Acțiunea observată a fost găsită mai intensă după administrarea FLP pe cale intraperitoneală. Pentru obținerea unui efect de aceeași intensitate pe cale per orală au fost necesare doze mai mari și administrări repetate timp de 4 zile.

3. Administrarea FLP după intoxicarea cu triton determină o scădere mai pronunțată a colesterolemiei și a lipemiei decît tratamentul preventiv.

4. Acțiunea FLP nu poate fi atribuită prezenței sulfomucopolizaharidelor, deoarece produsul studiat nu conține acest grup de compuși.

5. Efectul hipocolesterolemiant și hipolipemiant observat poate fi folosit ca test rapid pentru punerea în evidență a activității farmacologice a FLP.

Prezentată la redacție la 11 iunie 1966

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București

BIBLIOGRAFIE

1. I. A. Molnar, J. Winter, D. Winter, M. Simionovici, P. Tanko, *Prepararea unui factor lipotrop pancreatic și determinarea activității biologice*, St. cerc. biochim., **6**, 375 (1963).
2. D. K. Bosshardt, L. S. Cieresko, R. H. Barnes, *Preparation of a pancreatic derivative having lipotropic activity*, Amer. J. Physiol., **166**, 433 (1951).
3. L. Arrigo, T. Montini, *Extraction and purification of pancreatic enzymes by ionic exchange resine*, Quaderni della nutrizione, **14**, 1 (1954).
4. P. Bianchini, *Attivita lipolitiche di un eparinoide della mucosa duodenale*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **34**, 688 (1958).
5. I. A. Molnar, M. Simionovici, E. Tucicov, C. M. Georgescu, J. Winter, *Acțiunea mucopolizaharidelor din țesuturile tractului digestiv asupra metabolismului lipidic*, St. cerc. biochim., **9**, 49 (1966).
6. N. Ballardini, P. Paoletti, *Effect of Triton on the biosynthesis of liver lipides from different precursors*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **34**, 1413 (1958).
7. A. Soanu, O. Pasquale, *Triton hyperlipemy in dogs*, J. Exp. Med., **113**, 735 (1961).
8. A. Cresseri, *Individuazione e insolamento di taluno componenti in un preparato mucinico da mucosa gastrica di maiale*, Inst. C. Erba, Racolta di publ. Chem. Biol. med., **2**, 235 (1956).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 151 – 154 (1967)

DETERMINAREA GREUTĂȚII MOLECULARE A UNEI PROTEAZE ȘI A UNEI EXOTOXINE BACTERIENE PRIN METODA CROMATOGRAFIEI DE EXCLUDERE

G. SZEGLI cu colaborarea tehnică **MIOARA UNGUREANU**

576.8

Rezumat. — Folosind metoda cromatografiei de excludere (Sephadex G-100) s-a determinat greutatea moleculară aproximativă a unei proteaze și a unei exotoxine, izolată și purificată dintr-un filtrat de cultură al unor tulpini de *Citrobacter* (Bethesda — Ballerup) patogene.

În aceste condiții experimentale, proteaza are o greutate moleculară de ~40 000, iar exotoxina (factor letal) de ~ 75 000.

În 1956, Lathe și Ruthven [1], folosind o coloană de granule de amidon, au reușit să separe macromoleculele de anumiți compuși cu greutăți moleculare mai reduse.

După comercializarea particulelor de polidextran și poliacrilamidă (seria Sephadex G și Bio-Gel P, cu grade diferite de porozitate), metoda gelfiltrării a fost extinsă cu scop preparativ, pentru izolarea și purificarea moleculelor biologic active.

Deoarece metoda se bazează pe principiul excluderii moleculare [2—4], din rezultatele obținute se puteau primi și informații importante, legate de mărimea moleculară a substanțelor separate.

Începînd din anul 1961, această metodă a fost folosită și pentru determinarea greutății moleculare a diferitelor substanțe de interes biologic [5—8].

În lucrarea de față, folosind metoda cromatografiei de excludere, s-a determinat greutatea moleculară aproximativă a unei proteaze și a unei exotoxine (factor letal), izolate și purificate dintr-un filtrat de cultură al unor tulpini de *Citrobacter* (Bethesda-Ballerup) patogene.

MATERIALE ȘI METODE

Izolarea, purificarea, caracterizarea chimică și imunologică a acestor principii biologic active au fost descrise într-o lucrare anterioară [9].

Determinarea greutății moleculare a protezei și exotoxinei sus-amintite s-a efectuat cu ajutorul unei coloane de Sephadex G-100, 40—200 mesh (7,30×1,5 cm).

Pentru a obţine o coloană de gel uniform, s-a ţinut cont de indicaţiile date în această privinţă de Andrews [5].

Comportarea moleculelor solubile care trec printr-o coloană de Sephadex (seria G) se poate descrie prin coeficientul de distribuţie (Kd):

$$Kd = \frac{Ve - Vo}{Vi} \quad (1)$$

unde Ve este volumul de eluţie, Vo volumul de solvent în spaţiul interstiţial, iar Vi volumul de solvent din interiorul particulelor de gel.

Valoarea lui Vi a fost calculată din relaţia:

$$Vi = a \cdot Wr \quad (2)$$

unde a este cantitatea în grame a gelului în stare uscată din coloană (în cazul de faţă a = = 6,25 g), iar Wr cantitatea în grame a solventului care înbibă 1 gram gel (Wr în cazul G — 100 = 10 g/g).

Din relaţia (1) reiese că dacă substanţa cercetată nu poate pătrunde în porii particulelor de gel, Ve = Vo şi deci Kd = 0, iar cînd substanţa poate pătrunde în toţi porii şi este egal distribuită atît în interiorul cît şi în exteriorul particulelor de gel, Kd = 1.

Substanţele care pătrund parţial în porii acestor particule vor avea $Ve > Vo$ şi $< Vo + Vi$ iar valoarea lui Kd va fi între 0 şi 1. $Kd > 1$ indică o adsorbţie a substanţei în interiorul particulelor.

În experienţele de faţă, coloana de Sephadex G-100 a fost echilibrată timp de 6 zile cu tampon Tris-HCl 0,05 M + 0,1 M KCl, pH 7,50, acelaşi tampon fiind folosit şi pentru eluţie.

Viteza de scurgere a tamponului, în cazul fiecărei determinări, a fost reglată la 15 ml/oră. Pentru determinarea lui Vo s-au folosit 2 ml soluţie (5 mg/ml) de albastru de Dextran (Pharmacia Uppsala), cu greutatea moleculară de $2{,}0 \times 10^6$. Din trei coloane echilibrate, numai una singură a redat de trei ori consecutiv aceeaşi valoare pentru Vo (34,6) şi a fost folosită în experienţele ulterioare.

Între două determinări, coloana de Sephadex G-100 a fost spălată cu tamponul de eluţie timp de 48 de ore.

Pentru a putea aproxima prin această metodă greutăţile moleculare ale substanţelor cercetate, s-a trasat o curbă de calibrare (Kd⟷log. M), folosind următoarele substanţe cu greutăţi moleculare cunoscute: citocrom c (G.M. = 13 000), tripsină de 2 × cristalizată (G.M. = 35 000) şi albumină de bou de 2 × cristalizată (G.M. = 67 000). Substanţele etalon dizolvate în tamponul de echilibrare au fost introduse în coloană într-un volum de 2 ml conţinînd 5 mg proteine/ml.

REZULTATE

Proteaza bacteriană conţinînd 987 γ proteină şi 775 γ hexoze totale/ml avea o activitate de $2{,}9 \times 10^{-4}$ mE tirozină/ml. În coloană s-au introdus cîte 2 ml soluţie de protează şi din cele trei determinări consecutive valoarea medie a lui Ve era 44,0. Pentru determinarea Ve al exotoxinei (factorul letal) s-au folosit tot cîte 2 ml soluţie conţinînd 720 γ proteine şi 1100 γ hexoze totale/ml. Valoarea medie obţinută a lui V_e după trei determinări era 38,0.

Rezultatele obținute sînt prezentate grafic în figura 1.

După determinarea valorilor de Ve ale proteazei și ale exotoxinei, s-au putut aproxima greutățile moleculare ale acestor substanțe, prin

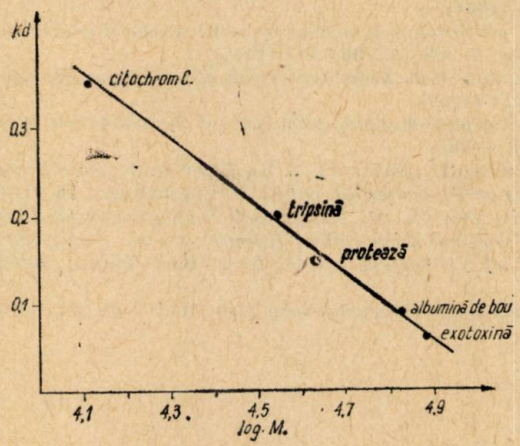


Fig. 1. — Curba standard reprezentînd valorile lui Kd față de log. greutăților moleculare ale unor proteine pe o coloană de Sephadex G-100 (1,5 × 73,0 cm), la pH 7,50.

intermediul curbei standard, stabilindu-se că proteaza are o greutate moleculară de ~ 40 000, iar exotoxina de ~ 75 000.

CONCLUZII

Folosind metoda cromatografiei de excludere (Sephadex G-100) în lucrarea de față s-a determinat greutatea moleculară aproximativă a unei proteaze (G.M. ~ 40 000) și a unei exotoxine (G.M. ~ 75 000) bacteriene.

Determinarea greutății moleculare a proteinelor prin cromatografia excluderii trebuie privită ca o metodă tentativă, dar accesibilă oricărui laborator de cercetare.

Prin această metodă se pot obține rezultate bune mai ales atunci cînd se lucrează cu proteine globulare, cu un conținut redus în glucide [5], [10].

Prezentată la redacție
la 3 noiembrie 1966

Secția de biochimie generală și imunochimie, Institutul „Dr. I. Cantacuzino", București

BIBLIOGRAFIE

1. Lathe G. H., Ruthven C.R.J., *The preparation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water*, Bioch. J., **62**, 665 (1956).
2. Flodin P., *Dextran gels and their applications in gel filtration*, Disertation, 85 pg., A.B. Pharmacia, Uppsala, Sweden, 1962.

3. PORATH J., *Some recently developed fractionation procedures and their application to peptide and protein hormones*, J. Appl. chem., **6**, 233 (1963).
4. SQUIRE P. G., *A relationship between the molecular weights of macromolecules and their elution volumes based on a model for Sephadex gel filtration*, Arch. Biochem., Biophys., **107**, 471 (1964).
5. ANDREWS P., *The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range*, Bioch. J., **96**, 595 (1965).
6. ANDREWS P., *Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration*, Bioch. J., **91**, 222 (1964).
7. CARNEGIE P. R., *A peptide-mapping technique for the estimation of molecular size*, Nature, **206**, 1128 (1965).
8. HAYES F. N., HANSBURG H., MITCHELL V. E., *Effect of the phosphorylation state of thymidine derivatives on Sephadex Kd. values*, J. Chromatogr., **16**, 410 (1964).
9. SZEGLI L., SZEGLI G., POPOVICI M., NESTORESCU N., *Separation of a hemolysin, a lethal factor and two proteases from culture filtrates of some pathogenic Citrobacter strains by means of DEAE Sephadex A-50*, Zentr. Bact. Parasit. Infekt. Hygiene, **200**, 497 (1966).
10. ANDREWS P., *Molecular-sive chromatography*, Brit. Med. Bull., **22**, 109 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 155–159 (1967)

STUDIUL COMPARATIV AL FOSFOLIPIDELOR DIN MUSCULATURA STRIATĂ ŞI NETEDĂ PRIN CROMATOGRAFIE ÎN STRAT SUBŢIRE

MIHAIL ŞERBAN

611.018.6

Rezumat. — Prin cromatografie în strat subţire s-a stabilit că în componenţa musculaturii striate şi netede intră majoritatea fosfolipidelor cunoscute şi că ambele tipuri de muşchi prezintă, în general, un fond fosfolipidic asemănător. Sfingomielina apare ca un constituent bine individualizat numai la muşchiul neted, atît la mamifer cît şi la amfibie. Comparativ cu lipidele totale, fosfolipidele musculare manifestă o constanţă a valorilor lor cantitative la ambele tipuri de muşchi, indiferent de evoluţia filogenetică.

Ţesutul muscular se caracterizează printr-un conţinut relativ mic de substanţe lipidice, care variază însă în limite destul de largi. Componentele fosfolipidice reprezintă aproximativ 1% şi se găsesc repartizate în general la nivelul membranei celulare, precum şi al unor particule subcelulare. Spre deosebire de lipidele neutre, acizii graşi şi colesterolul, fosfolipidele musculare prezintă o constanţă relativă mai mare, fiind considerate printre componentele structurale le muşchiului.

Cunoştinţele actuale despre natura şi distribuţia fosfolipidelor în diferite tipuri de muşchi, precum şi cele în legătură cu comportarea lor în dependenţă de travaliul sau starea de excitaţie musculară, sînt destul de limitate. Considerăm că abordarea unor astfel de cercetări este indicată, cu atît mai mult cu cît componentele fosfolipidice par să fie implicate în anumite procese ale activităţii musculare [1].

Dar problema fosfolipidelor musculare prezintă importanţă şi din punctul de vedere al biochimiei comparate. Astfel, investigarea acestor componente la diferite specii şi la diferite tipuri de muşchi care manifestă deosebiri de structură şi specific funcţional poate contribui la precizarea unor aspecte legate de unitatea sau diversitatea planului biochimic de organizare, ca reflectare a evoluţiei filogenetice.

În această notă se expun unele date comparative referitoare la natura, respectiv distribuţia fosfolipidelor din musculatura striată şi netedă, obţinute prin cromatografia în strat subţire. Investigaţii în acest sens nu s-au efectuat încă, iar aplicarea noii variante cromatografice, prezintă în comparaţie cu alte metode folosite pînă acum [2], unele avantaje pentru studiul fosfolipidelor [3–6].

MATERIAL ȘI METODE

Determinările s-au efectuat asupra extractelor lipidice totale obținute din mușchiul striat (gastrocnemian) și neted (stomac) de broască (*Rana ridibunda*), precum și din mușchii corespunzători — striat și neted — de șobolan alb. Mușchii prelevați au fost imediat spălați cu soluție fiziologică răcită la +4°C, tamponați cu hîrtie de filtru și apoi înghețați în azot lichid. Probe conținînd 6—8 mușchi au fost triturate în stare înghețată, iar pulberea fină obținută s-a cîntărit.

Extracția fracțiunii lipidice s-a făcut în principiu, după metoda Folch [7]. Ca mediu de extracție s-a utilizat amestecul $CHCl_3 : CH_3OH$ (2 :1 v/v), în raportul de 15 ml extractant la 1 g țesut. După o oră, omogenatul a fost filtrat și depozitul s-a spălat repetat cu amestec de $CHCl_3 : CH_3OH$ (2 :1); lichidul obținut s-a adus la un volum de 20 ml, cu același amestec. Ulterior s-au adăugat 4 ml apă distilată, sub agitare lentă. După 15 ore, sau după o centrifugare de 20 min la 2 500 g, s-au separat cele două faze formate. Faza superioară s-a îndepărtat fără tulburarea limitei de separare după care s-a procedat la o spălare repetată cu un amestec de $CHCl_3 : CH_3OH : H_2O$ (3 : 48 :47). Faza inferioară s-a adus cu CH_3OH și respectiv cu amestecul de $CHCl_3 : CH_3OH$ (2 :1) la un volum determinat.

Cromatografia în strat subțire s-a efectuat utilizînd ca suport de migrare Kieselgel G Merck (100 mesh). Suspensia de Kieselgel în apă distilată, obținută în raportul 1 :2, s-a depus într-un strat uniform de aproximativ 300—400 μ. După echilibrare la temperatura ambiantă, plăcile s-au activat la 120°C timp de o oră. Probele conținînd componentele fosfolipidice au fost depuse în volume de 3—5 μl la distanța de 1,5 cm de capătul plăcii. Ca lichid de irigare s-a utilizat amestecul $CHCl_3 : CH_3OH : H_2O$(70 :30 :5) obținut extemporaneu, plăcile fiind imersate 0,5 cm în acest amestec, sub un unghi de 25°. Timpul de irigare a variat între 30 și 40 min. Evidențierea globală a componentelor separate s-a făcut cu vapori de iod, molibdat de amoniu sau fluoresceină.

În paralel a fost analizat, prin același procedeu, extractul lipidic din creierul de șobolan, obținut în aceleași condiții. Întrucît rf-urile diferitelor fosfolipide cerebrale sînt bine cunoscute ele ne-au servit drept criteriu de comparație, concomitent cu efectuarea succesivă a unor reacții specifice (ninhidrină, reactiv Dragendorff, lumină ultravioletă). În scopul identificării diferitelor componente lipidice s-au cromatografiat de asemenea și unele soluții de referință ca: trioleină, colesterol, acid arahidonic, fosfatidilcolină, fosfatidiletanolamină.

Determinarea cantitativă a lipidelor totale extrase s-a efectuat prin metoda gravimetrică, iar a fosfolipidelor prin dozarea P, în prezența molibdatului de amoniu și a acidului 1 amino-2 naftol-4 sulfonic ca reducător [8]. Drept etalon a fost utilizată o soluție de KH_2PO_4 cu o concentrație în P de 20 μg/ml.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Datele obținute prin aplicarea cromatografiei în strat subțire ne-au permis stabilirea și aprecierea comparativă a compoziției în fosfolipide la cele două tipuri de mușchi, precum și precizarea unor aspecte în legătură cu distribuția acestor componente în țesutul muscular, la specii de vertebrate diferite. În figurile 1, 2 și 3 sînt redate rezultatele analizei cromatografice în strat subțire a extractelor lipidice din mușchiul neted și striat de broască și de șobolan, precum și a extractului lipidic din creierul de șobolan.

La ambele tipuri de mușchi, atît de broască cît și la șobolan, se evidențiază majoritatea fosfolipidelor cunoscute; sub acest aspect, se

poate stabili chiar o anumită corespondenţă cu fosfolipidele ţesutului cerebral, caracterizat printr-un conţinut mare şi variat în aceste substanţe [9].

Prin cromatografia în strat subţire se identifică în ţesutul muscular următoarele componente fosfolipidice, în ordinea valorii rf-ului lor: sfingomielina SM, lisofosfatidil-etanol-amina LPE, fosfatidil-colina PC (+plasmalogen-colina PLC), fosfatidil-etanol-amina PE (+ plasmalogen--etanol-amina PLE), acizi fosfatidici; pe lîngă acestea, se evidenţiază tot ca lipide complexe şi cerebrozidele.

Din datele obţinute, interpretate prin prisma biochimiei comparate, rezultă ca o caracteristică faptul că fosfolipidele musculare prezintă o trăsătură în general comună, care — în linii mari — se reflectă printr-o compoziţie calitativă asemănătoare. Într-adevăr, atît muşchiul neted cît şi cel striat conţin practic aceleaşi tipuri de fosfolipide. Dar acest fond fosfolipidic comun la cele două feluri de muşchi se manifestă nu numai în cadrul aceleiaşi specii, ci chiar la specii foarte diferite (mamifer, amfibie).

Asemănarea dintre muşchiul striat şi cel neted în ce priveşte compoziţia lor fosfolipidică s-ar putea atribui faptului că fosfolipidele reprezintă componente structurale ale ţesutului muscular indiferent de natura, specificul funcţional sau provenienţa acestuia. Totuşi, semnificaţia metabolică cel puţin a unora dintre fosfolipidele musculare nu poate fi diminuată: participarea fosfolipidelor la permeabilitatea membranei celulare, la transportul activ al ionilor, la sistemele multienzimatice oxidative sau intervenţia lor în mecanismul transportului de electroni atestă rolul activ pe care pot să-l joace aceşti compuşi.

O altă caracteristică a fosfolipidelor musculare o constituie existenţa unui grup de componente semnificative, şi anume: PC (+PLC) şi PE (+PLE). La ambele tipuri de muşchi, PC şi PE sînt fluorescente în lumină ultravioletă, prima fiind mai intensă decît cealaltă. Valoarea cantitativă mare a acestora constituie o notă distinctivă pentru compoziţia în fosfolipide a muşchiului striat şi neted, subliniind totodată un alt aspect al trăsăturii comune evidenţiate la nivelul fosfolipidelor din ţesutul muscular, atît la mamifer cît şi la amfibie. În figurile 4 şi 5 sînt redate rezultatele identificării prin reacţii specifice a PC şi PE. Comparativ cu acestea, celelalte lipide complexe din muşchiul neted şi striat de broască şi şobolan (SM, LPE, cerebrozide, acizi fosfatidici), se află în raporturi cantitative evident mai mici.

Este de remarcat că deşi, în general, între muşchiul striat şi cel neted există o asemănare a compoziţiei în fosfolipide, totuşi spectrul cromatografic al acestora prezintă şi unele particularităţi în funcţie de tipul de muşchi. Astfel, în cazul muşchiului neted, atît la şobolan cît şi la broască, spoturile 1, 2 şi 3 (figura 1*A* şi 2 *A*) corespunzătoare SM, LPE şi PC sînt net individualizate în raport cu spoturile din zona respectivă de la muşchiul striat. În acest ultim caz, se semnalează ca bine individualizat numai spotul 3 al PC (+PLC), la care este ataşată însă o trenă nediferenţiată (figurile 1 *B* şi 2 *B*); această trenă corespunde ca rf spotului 2 de la muşchiul neted. Prin reacţia Dragendorff [10], ca şi prin analogie cu valorile rf ale spoturilor corespunzătoare din extractul lipidic din creier sau al lecitinei etalon, spotul 1 de la muşchiul neted de broască

şi şobolan s-a identificat ca SM, iar spotul 3 de la ambele tipuri de muşchi ca PC. Spotul intermediar 2 de la muşchiul neted, ca şi trena corespunzătoare acestui spot de la muşchiul striat, s-au identificat ca LPE, prin reacţia uşor pozitivă cu ninhidrina. Rezultă aşadar că în cazul muşchiului neted se evidenţiază prezenţa SM, componentă neidentificată însă în cazul muşchiului striat. Această deosebire dintre cele două tipuri de muşchi se constată atît la mamifer cît şi la amfibie. Este de notat şi faptul că în partea superioară a spotului PE de la muşchiul striat de şobolan se observă o slabă tentă cu reactivul Dragendorff, după cum la partea superioară a spotului PC — mai ales la muşchiul striat de şobolan — se observă o uşoară tentă cu ninhidrină. O comportare similară se constată la extractul lipidic din creier. Aceşti compuşi, aflaţi în cantităţi mici şi care probabil reprezintă produşi de liză ai unor fosfatide, nu au fost identificaţi.

După cum se poate remarca din figurile 1 şi 2, raporturile cantitative (ca intensitate şi suprafaţă) dintre diferitele spoturi ale lipidelor simple şi complexe sînt deosebite de la un tip de muşchi la altul, sau, în cazul aceluiaşi tip, de la o specie la alta. Aceste deosebiri trebuie însă apreciate în funcţie de concentraţia lipidelor totale, respectiv a fosfolipidelor din muşchiul striat şi din cel neted de la cele două vertebrate.

Din tabela 1 rezultă că lipidele totale din muşchiul striat şi neted de broască au valori apropiate, o uşoară creştere sesizîndu-se în cazul

Tabela 1

Valorile cantitative ale lipidelor totale şi ale fosfolipidelor din muşchiul striat şi neted de amfibie (broască) şi din muşchiul şi striat şi neted de mamifer (şobolan), în comparaţie cu ţesutul cerebral (valorile reprezintă media de 4–6 determinări şi sînt exprimate în g% ţesut)

Proveniența probei	Lipide totale	Valori extreme	Fosfolipide	Valori extreme
Muşchi striat (broască)	1,00	0,90–1,12	0,85	0,80–0,92
Muşchi neted (broască)	1,12	1,06–1,20	0,84	0,80–0,89
Muşchi striat (şobolan)	2,21	2,06–2,30	0,85	0,70–1,00
Muşchi neted (şobolan)	3,00	2,80–3,22	0,96	0,82–1,10
Creier (şobolan)	9,80	9,70–9,90	6,60	6,30–7,00

muşchiului neted. Din contră, la muşchiul striat şi neted de şobolan se constată diferenţe notabile în conţinutul de lipide totale, care este mai mare în cazul muşchiului neted. Se remarcă totodată diferenţe evidente între valorile lipidelor totale din cele două tipuri de muşchi de şobolan, în raport cu muşchiul striat şi neted de broască. Într-adevăr, aceste diferenţe apar duble sau chiar mai mari la muşchiul de mamifer faţă de cel de amfibie.

În comparaţie cu variaţia conţinutului în lipide totale, fosfolipidele prezintă o constanţă a valorilor lor cantitative la ambele tipuri de muşchi şi la ambele specii de vertebrate. Cu toate acestea, raportate la valorile lipidelor totale, fosfolipidele din muşchiul striat şi neted de broască reprezintă 75%, respectiv 85%, pe cînd fosfolipidele din muşchiul striat şi neted de şobolan reprezintă 32%, respectiv 38%. Comparativ cu ţesutul muscular, fosfolipidele din creier constituie aproximativ 67% din conţinutul lipidic total.

CONCLUZII

1. Prin cromatografia în strat subțire s-a precizat că în compoziția țesutului muscular striat și neted provenit de la vertebrate îndepărtate pe plan filogenetic intră majoritatea fosfolipidelor cunoscute. Sub acest raport, datele obținute pot prezenta o anumită semnificație și din punctul de vedere a biochimiei comparate.

2. Ambele tipuri de mușchi, atît de mamifer cît și de amfibie, manifestă, în linii mari, un fond fosfolipidic asemănător prin natura, respectiv prin distribuția componenților, precum și prin existența unor fosfolipide semnificative: fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina.

3. În cadrul acestei trăsături în general comune s-au evidențiat și unele particularități: sfingomielina apare ca un component bine individualizat numai la mușchiul neted, atît la mamifer cît și la amfibie.

4. Comparativ cu lipidele totale, fosfolipidele musculare prezintă — în valoare absolută — o constanță a conținutului lor la ambele tipuri de mușchi, indiferent de evoluția filogenetică.

Prezentat la redacție
la 24 octombrie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
București

BIBLIOGRAFIE

1. G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, *Phospholipids, Chemistry, Metabolism and Function*, Elsevier Publ., Amsterdam, 1964.
2. G. V. Marinetti, R. F. Witter, E. Stotz, *The incorporation in vivo of P^{32}-labelled orthophosphate into individual phosphatides of rat tissues*, J. Biol. Chem., **226**, 475 (1957).
3. E. Stahl, *Dünnschicht Chromatographie*, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.
4. S. B. Curri, M. Șerban, *L'application de la méthode chromatographique en couche mince à l'histotopochimie des lipides : l'histochromatographie*, Rev. roum. biochim., **IV**, 88 (1967).
5. S. B. Curri, *Nuovi orientamenti sul significato biologico e terapeutico dei fosfolipidi*, Bioch. Biol. Sper., **III**, 79 (1964).
6. S. B. Curri, P. Vecchia, V. Mursia, *Distribuzione quantitativa dei fosfolipidi nel sistema nervoso centrale*, Bioch. Biol. Sper., **I**, 202 (1961).
7. J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*, J. Biol. Chem., **226**, 497 (1957).
8. S. Natelson, *Microtechniques of clinical chemistry*, Springfield, Illinois, 1963.
9. L. Freysz, J. Nussbaum, R. Bieth, P. Mandel, *Les phospholipides du cerveau de rat au cours de la croissance post-natale*, Bull. Soc. Chim. Biol., **XLV**, 1019 (1963).
10. P. Gonzato, *La cromatografia su strato sottile applicata allo studio di miscele fosfolipidiche*, Bioch. Biol. Sper., **II**, 334 (1963).

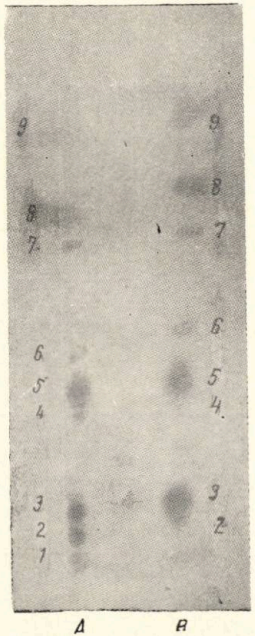


Fig. 1. — *Cromatografia în strat subţire a extractului lipidic din muşchiul neted (A) şi striat (B) de broască.*

1 — sfingomielina, *2* — lisofosfatidil-etanol-amina, *3* — fosfatidil-colina (+ plasmalogen-colina), *4* — plasmalogen-etanol-amina, *5* — fosfatidil-etanol-amina, *6* — cerebrozide, *7* — acizi fosfatidici, *8* — colesterol, *9* — acizi graşi + trigliceride.

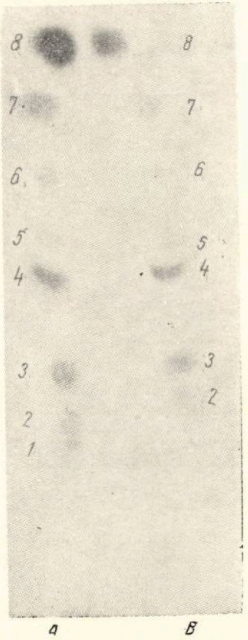


Fig. 2. — *Cromatografia în strat subţire a extractului lipidic din muşchiul neted (A) şi striat (B) de şobolan.*

1 — sfingomielina, *2* — lisofosfatidil-etanol-amina, *3* — fosfatidil-colina (+ plasmalogen-colina), *4* — fosfatidil-etanol-amina (+ plasmalogen-etanol-amina), *5* — cerebroziде, *6* — acizi fosfatidici, *7* — colesterol, *8* — acizi graşi + trigliceride.

Fig. 3. — *Cromatografia în strat subţire a extractului lipidic din creierul de şobolan.*

1 — sfingomielina, *2* — neidentificat; *3* — lisofosfatidil-etanol-amina, *4* — fosfatidil colina, *5* — fosfatidil-etanol-amina, *6* — cerebrozide, *7* — acizi fosfatidici, *8* — colesterol, *9* — acizi graşi + trigliceride.

Fig. 4. — *Evidenţierea prin reacţii specifice a fosfatidil-colinei (1), fosfatidil-etanol-aminei (2) şi sfingomielinei (3) din muşchiul neted (A) şi striat (B) de broască.*

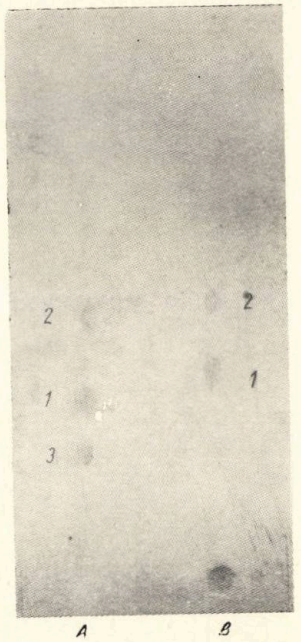


Fig. 5. — *Evidenţierea prin reacţii specifice a fosfatidil-colinei (1), fosfatidil-etanol-aminei (2) şi sfingomielinei (3) din muşchiul neted (A) şi striat (B) de şobolan.*

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2,161–165 (1967)

METODĂ SIMPLIFICATĂ DE PREPARARE A CISTEIN-DESULFHIDRAZEI

ELENA TEODORU şi STELA GHEŢIE

577.1

Rezumat. — S-a simplificat procedeul original de obţinere a enzimei cistein-desulfhidrazei din sacul vitelin al ouălor embrionate.

Dublînd volumul de extracţie cu soluţie de NaCl 0,0775 M, se extrage o cantitate dublă de enzimă faţă de cea obţinută conform tehnicii originale.

Preparatul liofilizat, după precipitare cu etanol (enzima$_1$) şi preparatul liofilizat după precipitare cu etanol şi $(NH_4)_2SO_4$ (enzima$_2$) manifestă aceeaşi activitate enzimatică, acelaşi aspect electroforetic unitar şi aceleaşi activităţi specifice şi randamente în schimbul izotopic.

Enzima liofilizată îşi micşorează repede activitatea dacă este păstrată la temperaturi mai mari de —10°C.

Literaura de specialitate [1] descrie o metodă de preparare a cistein-desulfhidrazei din sacul vitelin al ouălor embrionate, capabilă să realizeze un schimb izotopic între cisteina nemarcată şi Na_2S^{35}, introdusă în mediul de reacţie.

Enzima rupe legătura —C—S— a cisteinei, cu formarea unei substanţe tricarbonice nesaturate, instabilă, care adiţionează în continuare H_2S marcat cu S^{35} (introdus în mediul de reacţie sub formă de Na_2S) pentru a rezulta cisteină marcată cu sulf.

Obţinerea cisteinei marcate cu S^{35} pe calea biochimică sus-amintită prezintă două avantaje importante faţă de metoda preparativă sintetică [2], şi anume: tehnica de lucru este mult mai simplă, iar produsul obţinut are o înaltă puritate.

Scopul prezentei lucrări a fost să verifice în ce măsură simplificarea tehnicii originale [1] de preparare a cistein-desulfhidrazei influenţează calitatea enzimei şi randamentul schimbului izotopic urmărit.

MATERIAL ŞI METODE

1) Obţinerea enzimei

Tehnica de extragere cuprinde următoarele operaţii:

a) Extragerea enzimei din sacul vitelin al ouălor embrionate (după incubare de 17—18 zile) cu soluţii cloruro-sodice 0,145 M şi 0,0775 M.

b) Tratarea extractului salin cu eter etilic la 0°C şi separarea fazei apoase, care conţine enzima.

c) Precipitarea proteinelor din faza apoasă cu etanol (conc. finală 20 %), la 0°C.

d) Dizolvarea precipitatului obţinut în soluţie cloruro-sodică 0,145 M şi reprecipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ (conc. finală 23,55 %), la 0°C.

e) Liofilizarea supernatantului (în prealabil dializat 48 de ore la 0°C şi ultracentrifugat la 40 000 g 1 oră la 0°C.

2) Determinarea activităţii enzimatice

Reactivi: $Cd(CH_3COO)_2$ M; I_2 în IK 0,2 M; HCl N; $Na_2S_2O_3$ 0,01 N; L-cisteină-HCl 0,05 M; soluţie enzimatică în tampon fosfaţi M/15 pH 7,4—7,6.

Tehnica de măsurare a activităţii enzimatice urmăreşte determinarea cantităţii de H_2S produs, cu ajutorul aparatului Warburg [3].

În cupă se introduc 2 ml soluţie enzimatică. S-a ales concentraţia enzimei de 2 mg/2 ml după ce s-a verificat liniaritatea reacţiei pentru diferite concentraţii de enzimă la concentraţie fixă de substrat (fig. 1).

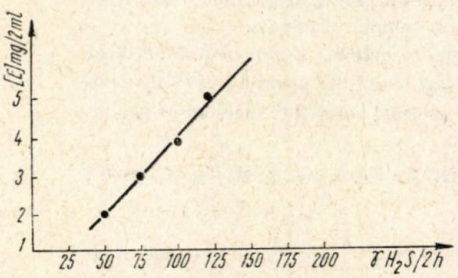


Fig. 1. — Liniaritatea reacţiei enzimatice la concentraţii diferite de enzimă şi concentraţie fixă de substrat.

În diverticul se introduc 0,4 ml substrat L-cisteină. HCl. În insetul cupei se plasează un filtru adsorbant, peste care se introduc 0,3 ml $Cd(CH_3COO\gamma T)_2$. Paralel se efectuează şi un martor (fără enzimă). Probele se gazează 15 min cu N_2, se termoechilibrează 15 min la 37°C, apoi se determină cantitatea de H_2S degajat, după 2 ore de la declanşarea reacţiei. Acesta se adsoarbe pe filtrul adsorbant cu formare de SCd. Precipitatul depus este tratat cu 0,1 ml HCl + 0,2 ml I_2. Cantitatea de I_2 consumată în reacţia de oxidare a S^{2-} la S liber se determină prin titrare cu $Na_2S_2O_3$. Diferenţa de titrare a martorului faţă de probă în ml $Na_2S_2O_3$ 0,01 N permite calcularea cantităţii de H_2S eliberată în reacţia enzimatică (1 ml $Na_2S_2O_3$ 0,01 N corespunde la 170 γH_2S).

3) Analiza electroforetică a preparatului enzimatic

Electroforeza s-a efectuat în gel de agar 1,3 %: tampon veronal-veronal sodic, pH 8,6 concentraţia în cuvă $\mu = 0{,}05$, concentraţia în plăci $\mu = 0{,}15$; potenţialul 20 V/cm, intensitatea 0,8 A/cm, durata migrării 1 1/2 ore; coloraţie cu Amidoschwarz 10 B.

4) Analiza cromatografică a cisteinei şi cistinei

Cromatografierea [4] se efectuează pe hîrtie Whatmann nr. 1 în amestecul de solvenţi: n-butanol-apă distilată-acid formic-etanol absolut (40 : 40 : 10 : 2). Se aplică 0,04—0,05 ml din soluţiile probelor de analizat în conc. de 1 % pe linia de start, alături de martor (cisteină + γ+ cistină) soluţie 1 %. Hîrtia se lasă 1—2 ore în mediul de saturare, după care se irigă ascendent şi se lasă să migreze 12—14 ore. Cromatograma se usucă şi se stropeşte cu ninhidrină pentru developare. Pentru obţinerea radiocromatogramelor, cromatogramele se pun în contact cu filme radiologice, în casete obişnuite de radiologie şi, în funcţie de activitatea aplicată, se lasă la impresionat 3—4 săptămîni, după care se developează. Rf-urile obţinute în acest sistem sînt: cisteină 0,05 şi cistină 0,38. Se determină activităţile specifice în mC/mM probă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

1) Creşterea extractibilităţii enzimei

La prima operaţie de omogenizare a sacului vitelin rezultă o pastă densă, a cărei extracţie cu soluţie de NaCl 0,145 M, în raportul de volume specificat în tehnica originală (1/10), este anevoioasă. S-a scăzut concentraţia soluţiei la 0,0775 M şi s-a dublat volumul de extracţie (1/20), obţinîndu-se astfel o serie de probe în care cantitatea de enzimă extrasă a fost dublă (activitate enzimatică 24,81 γ H_2S/mg preparat), faţă de cea din seria probelor extrase după tehnica originală (activitate enzimatică 12,70 γ H_2S/mg).*

2) Simplificarea procedeului de obţinere a cistein-desulfhidrazei

S-a suprimat operaţia de precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$ care obligă la manipulări de lungă durată (dializă, ultracentrifugare etc.), iar supernatantul obţinut după precipitare cu etanol s-a liofilizat (enzima$_1$). Paralel s-a lucrat şi conform tehnicii originale, liofilizînd preparatul obţinut după precipitare cu etanol şi $(NH_4)_2$ SO_4 (enzima$_2$). S-a comparat activitatea enzimatică a celor două preparate şi din rezultatele înfăţişate în tabela 1 se vede că *enzima$_1$* are aceeaşi activitate ca şi *enzima$_2$*, ceea ce îndreptăţeşte simplificarea adusă de noi, permiţînd reducerea operaţiilor de obţinere a preparatului enzimatic urmărit.

Tabela 1

Compararea activităţii enzimatice a preparatelor enzimatice obţinute prin precipitare cu etanol şi cele obţinute prin precipitare cu etanol şi $(NH_4)_2SO_4$

Preparatul	Caracteristica preparatului	Activitatea enzimatică (γH_2S/mg enzimă)*
Enzima$_1$	Precipitat cu etanol	25,97
Enzima$_2$	Precipitat cu etanol şi $(NH_4)_2SO_4$	25,30

* Rezultatele reprezintă media a două determinări făcute pe trei probe diferite din fiecare serie.

3) Analiza electroforetică a preparatelor enzimatice

Se observă din figura 2 că enzima$_1$ prezintă o singură fracţiune, dovedind o puritate satisfăcătoare a preparatului, ceea ce confirmă rezultatele înregistrate cu privire la activitatea enzimatică a celor două preparate.

4) Influenţa calităţii cistein-desulfhidrazei asupra schimbului izotopic

S-au efectuat probe paralele cu enzima$_1$ şi enzima$_2$, recuperîndu-se activităţile specifice ale celor două preparate. S-a constatat că valorile sînt foarte apropiate, γ şi anume : enzima$_1$ are activitatea specifică de 0,39

* Rezultatele reprezintă media a 2 determinări, făcute pe 3 probe diferite din fiecare serie.

mC/mM, iar enzima$_2$ are activitatea specifică de 0,35 mC/mM (faţă de 0,5 mC/mM teoretic). Aceste rezultate confirmă pe cele arătate mai sus. Enzima$_1$ poate fi utilizată la cataliza schimbului izotopic cu aceeaşi eficacitate ca şi enzima$_2$

Autoradiogramele* (fig. 3) arată că produsul final rezultat este un amestec de cistină-cisteină-S^{35}. Alte impurităţi sau substanţe de balast nu au fost semnalate cromatografic, ceea ce confirmă avantajele acestei metode de preparare a cisteinei-S^{35} pe calea bioschimbului izotopic, în prezenţa cistein-desulfhidrazei.

5) Influenţa temperaturii de păstrare a enzimei asupra activităţii sale

Întrucît cistein-desulfhidraza preparată este utilizată în timp la prepararea cisteinei marcate, s-a urmărit în ce măsură condiţiile de păstrare pot influenţa activitatea enzimatică. Din tabela 2 se vede că este obligator ca preparatul enzimatic liofilizat să fie păstrat la —10°C.

Tabela 2

Influenţa temperaturii de păstrare a enzimei asupra activităţii acesteia

Preparatul	Temperatura de păstrare	Durata de păstrare (ore)	Activitatea enzimatică (γH_2S mg enzimă)*
1	—10	240	24,81
2	0—4	24	11,56
3	20—25	24	6,01

* Rezultatele reprezintă media a două determinări făcute pe trei probe diferite din fiecare serie.

Este interesant de remarcat că preparatele obţinute din ouă de primăvară au prezentat o activitate enzimatică mai mică (12,80 γ H_2S/mg enzimă). Se pare că anotimpul ar influenţa conţinutul enzimatic al sacului vitelin; întrucît nu dispunem de date suficiente, nu putem face o afirmaţie categorică în acest sens, urmînd să verificăm ulterior această observaţie.

CONCLUZII

1. Rezultatele prezentate îndreptăţesc modificările aduse tehnicii originale la obţinerea cistein-desulfhidrazei, modificări ce simplifică considerabil operaţiile de obţinere ale enzimei.

2. Dublarea volumului de extracţie cu soluţie NaCl 0,0775 M, creşte extractibilitatea enzimei.

---

* Autoradiogramele s-au efectuat la Institutul de medicină nucleară din Cluj.

3. Suprimarea precipitării suplimentare cu $(NH_4)_2$ SO_4 nu modifică activitatea enzimatică, aspectul electroforetic și randamentul schimbului izotopic.

4. Temperatura de păstrare a preparatului enzimatic trebuie să fie sub —10°C.

Prezentat la redacție
la 20 mai 1966

Laboratorul de radiochimie, Institutul de cercetări chimice, București și Laboratorul de chimie biologică I, Institutul medico-farmaceutic, București

BIBLIOGRAFIE

1. Chapeville T., Br. Fr. nr. 1, 224.192/1960 (Brevet francez, patent).
2. Murray A., Williams D. L., *Organic synthesis with isotopes*, vol. II, p. 1965. Intersc. Publ., New York, 1958.
3. Colowick S., Kaplan N., *Methods in enzymology*, vol. II, p. 315, Academic Press, New York, 1955.
4. Szántay I., Kovács V., Uray Z., Fărcășanu M., *Utilizarea rășinilor schimbătoare de ioni, a radiocromatografiei, în cercetări de chimie biologică (II)*. Studia Univ. Babeș-Bolyai Cluj (seria Chemia), **1**, 399 (1963).

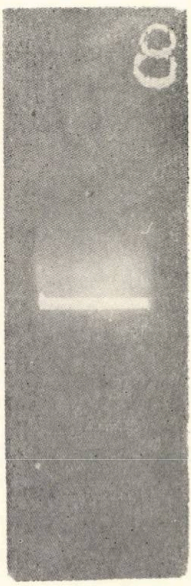


Fig. 2. — Electroforegrama preparatului enzimatic (enzima$_1$).

Fig. 3. — Autoradiocromatograma produsului obținut, cisteină-S^{35} + cistină.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 167—172 (1967)

STUDIUL TOXICOLOGIC ŞI BIOCHIMIC A DOI DERIVAŢI DE VITAMINĂ B_1 CU RESORBŢIE PER ORALĂ SUPERIOARĂ TIAMINEI

NOTA 1. INDICELE DE TOXICITATE PE CALE P. O. ŞI I. V. LA ŞOARECE ŞI NIVELELE SANGUINE LA ŞOBOLAN

D. WINTER, INGEBORG HÄDRICH, SANDA SAUVARD şi CORNELIA STĂNESCU

612.2

Rezumat. — S-a determinat indicele de toxicitate (DL.50) a doi derivaţi de tiamină cu ciclu tiazolic deschis, ditiopropil-tiamina (D.T.P.) şi S-etoxi-carbonil-tiamina (S.E.C.T.), comparativ cu clorhidratul de tiamină. Raportul între DL.50 pe cale i.v. şi p.o. a fost găsit 1/8 şi respectiv, 1/12, în cazul derivaţilor, faţă de 1/90 în cazul vitaminei B_1, ceea ce demonstrează resorbţia lor superioară pe cale p.o., comparativ cu vitamina B_1.

Urmărind nivelele sanguine după administrarea p.o. a unor doze echimoleculare din toate cele trei substanţe, s-au găsit valori de 20—50 ori mai mari în cazul derivaţilor decît în cazul vitaminei B_1. Folosind doze chiar de 10 ori mai mici din cei doi derivaţi, între 45 min şi 24 ore, nivelele lor sanguine au fost mai ridicate şi de mai lungă durată decît în cazul administrării vitaminei B_1.

Administrarea parenterală a vitaminei B_1 asigură rapid o concentraţie utilă în sînge şi ţesuturi, pe cînd administrarea p. o. necesită doze foarte mari, datorită resorbţiei deficitare a vitaminei la nivelul intestinului, şi nu realizează niciodată concentraţiile obţinute pe cale parenterală.

Această resorbţie deficitară este datorită pe de o parte proprietăţilor fizico-chimice ale vitaminei (liposolubilitate redusă şi descompunere sub influenţa tiaminazei), pe de alta particularităţilor sale de metabolism, ea resorbindu-se parţial sub formă fosforilată şi parţial ca atare.

Organismul are un prag de resorbţie pentru forma fosforilată (T.P.F., tiamin-pirofosfat), deoarece nu realizează niciodată depozite de vitamină B_1, excesul fiind eliminat [3], [12], [14].

Administrarea p. o. a dozelor mari de vitamină B_1 a arătat că de la o anumită doză se obţine o plafonare în ceea ce priveşte resorbţia, împiedicînd uneori atingerea unor concentraţii terapeutice utile [10]. De altfel, raportul între resorbţia parenterală şi cea orală este ilustrat şi de

raportul foarte mic între DL.50 i. v. şi DL.50 p. o., care la unele animale are o valoare de cca. 1/40 [12].

În 1952, Fujiwara şi Watanabe [5] au izolat pentru prima dată o tiamină cu ciclu tiazolic deschis (allil-tiamina), după care au apărut în literatură numeroşi derivaţi de tiamină care s-au dovedit a avea o resorbţie p. o. superioară vitaminei B_1. În acest fel a devenit posibilă realizarea unei medicaţii eficiente cu vitamină B_1 şi pe cale p. o.

Proprietăţile chimice comune derivaţilor cu ciclu tiazolic deschis se referă la : capacitatea lor de a da baze stabile şi bine cristalizate ; liposolubilitate crescută ; lipsa reacţiei directe a tiocromului în reacţia specifică vitaminei B_1 (cu ciclu tiazolic închis) [6].

Din punct de vedere biochimic şi farmacologic, aceşti derivaţi au cîteva caracteristici comune, şi anume : se transformă în organism în vitamină B_1 (se reciclizează în ficat, fie în prezenţa agenţilor reducători de tipul cisteinei sau glutationului, fie printr-o intervenţie enzimatică [6], crescînd nivelul cocarboxilazei [6—8] hepatice ; se resorb mai bine ca vitamina B_1 pe cale p. o. [1], [6], [9], [10], [15], [16] ; au eficacitate de tip vitaminic (experimental şi clinic) egală cu cea a vitaminei B_1.

În prezenta lucrare se prezintă rezultatele determinărilor referitoare la indicele de toxicitate acută la şoarece şi resorbţia în cazul administrării p. o. la şobolani, a 2 derivaţi de vitamină B_1 cu ciclu tiazolic deschis, ditiopropil-tiamina (D.T.P) şi S-etoxi-carbonil-tiamina (SECT).

MATERIAL ŞI METODE

1. S-a determinat la şoarece toxicitatea acută (DL.50) în cazul administrării i.v. şi p.o. a produselor. Calculul DL.50 şi al limitelor de securitate s-a realizat prin metoda probitului grafic [2]. În cazul administrării i.v., ritmul de administrare a fost lent (1 ml/100 s). S-au folosit şoareci masculi de 18—22 g, loturi de 10 animale pentru o doză.

2. S-au urmărit la şobolani masculi de 120—160 g nivelele sanguine după administrarea p.o. a vitaminei şi derivaţilor, la diferite doze şi intervale de timp.

La intervale fixe după administrare (45 şi 90 min ; 3, 6, 12 şi 24 ore) s-a recoltat sînge, din artera carotidă, prin sacrificarea animalelor. Probele de sînge au fost recoltate pe oxalat de sodiu. La aceste probe s-a determinat conţinutul în vitamină B_1 totală prin metoda Friedman [4], [11], iar în cîteva cazuri şi conţinutul diferenţiat în vitamină liberă şi legată. În materialul biologic, în general tiamina şi T.P.F. se găsesc legate de proteine. Printr-o extracţie în mediu acid, la cald, se realizează hidroliza acestei legături, iar ulterior, în mediu alcalin, se realizează oxidarea tiaminei în tiocrom a cărui fluorescenţă se citeşte în u.v. Dozarea vitaminei libere şi legate (T.P.F.) s-a efectuat prin determinarea tiocromului înainte şi după hidroliza extractelor cu fosfatază. (Fosfataza a fost preparată după Westenbrink [17], din drojdie de bere).

La fiecare doză şi interval s-au folosit loturi de minim 5 animale. S-au folosit următoarele substanţe : clorhidrat de tiamină, ditiopropil-tiamină (D.T.P.) şi S-etoxi-carbonil-tiamina (S.E.C.T.) sintetizate la I.C.C.F. de un colectiv condus de ing. Mariana Ionescu şi ing. Eva Drăgoi. Aceste din urmă substanţe au fost administrate la animale sub formă de clorhidrat preparat extemporaneu. Dozele din fiecare substanţe sînt indicate în tabele.

REZULTATE

1. Toxicitatea acută la șoarece

În tabela 1 sînt indicate valorile DL.50 pe diferite căi de administrare și raportul între DL.50 p. o. și parenteral în cazul celor 2 produși studiați.

Tabela 1

Toxicitatea acută a derivaților de tiamină cu ciclu tiazolic deschis

Substanța	DL.50 (mg/kg i.v.)	Limita de securitate	DL.50 (mg/kg p.o.)	Limita de securitate	Raportul DL.50 i.v. / DL. 50 p.o.
Clorhidrat B_1	89,2	84,2—118	8224	6310—10000	1/190
D.T.P. (clorhidrat)	302	279—382	2512	1679—3549	1/8
S.E.C.T. (clorhidrat)	339	296—378	4250	2819—6607	1/12

Din aceste date reiese că:

— Derivații D.T.P. și S.E.C.T. au o toxicitate mai redusă (semnificativă statistic) decît B_1 la administrare i. v. și mai crescută (semnificativă statistic) la administrare p. o.

— Raportul între DL.50 i. v și DL.50 p. o. indică astfel resorbția p. o. crescută a acestor derivați în comparație cu vitamina B_1.

— Între DL.50 ale D.T.P. și S.E.C.T. nu apar diferențe statistic semnificative, dar, atît în cazul administrării p. o. cît și i. v., D.T.P. apare ceva mai toxic decît S.E.C.T.

2. Nivele sanguine după adminstrare p. o. la șobolan

În tabela 2 sînt indicate rezultatele obținute la 3 ore după administrarea unei doze unice de 500 mg/kg vitamină B_1 (și doze echimoleculare din cei 2 derivați). Din acest tabel reiese că, la 3 ore, nivelul obținut

Tabela 2

Nivelele sanguine la 3 ore după administrarea unei doze unice p.o. de 500 mg/kg/kg clorhidrat de tiamină și a unor doze echivalente molecular din cei doi derivați

Substanța	Doza (mg/kg)	Conc. μg/ml sînge tiamină totală	E.S.	Raport concentrație derivați/B_1
B_1	500	5,7	±1,2	—
D.T.P.	550	127,0	±47	22
S.E.C.T.	550	297,0	±31	52

cu derivații de B_1 este de 20—50 ori mai mare decît cel obținut cu B_1, folosind doze egale. S.E.C.T. determină nivelele cele mai ridicate (diferențele între D.T.P. și S.E.C.T. nu sînt semnificative statistic).

Urmărind comparativ curba tiaminemiei la diferite intervale de timp (45 minute — 24 ore) datorită diferenței mari între concentrațiile obținute pe de o parte cu B_1 iar pe de altă parte cu cei 2 derivați, dife-

renţe care produc perturbări în metoda de analiză, am folosit din derivaţii respectivi doze de 10 ori mai mici. În tabela 3 sînt indicate valorile obţinute în aceste condiţii. Folosind chiar doze de 10 ori mai mici din derivaţii de vitamină B_1, la toate intervalele între 45 min şi 24 ore, nivelul sanguin obţinut este superior celui obţinut cu vitamină B_1. Diferenţele sînt semnificative statistic între S.E.C.T. şi B_1 la toate intervalele, iar în cazul D.T.P. şi B_1 la 12 şi 24 de ore.

Tabela 3

Nivelele sanguine – la intervale de timp diferite – după administrarea unor doze unice p.o. de vitamină B_1 şi de derivaţi (conc. µg/ml sînge tiamină totală ± E.S)

Timp de la administrare	Vitamină B_1 (500 mg/kg)	D.T.P. (55 mg/kg)	S.E.C.T. (55 mg/kg)
45 min	2,1±0,1	3,06±0,6	31,0±2,6
90 min	1,9±0,2	—	—
3 ore	4,3±0,7	5,75±3,0	39,0±8,2
4 1/2 ore	3,8±0,2	—	—
6 ore	3,6±0,4	—	—
12 ore	0,9±0,03	5,4±2,5	8,0±4,6
24 ore	0,7±0,02	1,4±0,1	2,4±0,8

În cazul administrării S.E.C.T. se obţin, la toate intervalele, nivele sanguine mai ridicate decît cu D.T.P., iar la 24 de ore persistă încă în sînge o cantitate apreciabilă de vitamină, în timp ce în cazul vitaminei B_1 sau al D.T.P. cantităţile prezente sînt la acest interval sub 1 gama/ml.

În cazul tuturor substanţelor curba sanguină este asemănătoare, avînd un maxim în jur de 3 ore. Pentru a urmări capacitatea de esterificare a derivaţilor, comparativ cu vitamina B_1, s-a efectuat la un număr de probe şi o dozare paralelă de tiamină liberă şi T.P.F., la 3 ore de la administrarea dozei de 500 mg/kg vitamină B_1 şi 55 mg/kg S.E.C.T. şi D.T.P. Rezultatele sînt trecute în tabela 4.

Tabela 4

Nivele sanguine – la 3 ore – după administrarea p.o. a unei doze unice de vitamina B_1 şi derivaţi (conc. µg/ml sînge)

Substanţa	Doza (mg/kg)	Tiamină liberă	Tiamină legată	Tiamină totală	% tiamină legată
B_1	500	0,1	2,4	2,5	96
	500	0,1	1,4	1,5	93
D.T.P.	55	0,8	7,7	8,5	90
	55	1,9	5,1	7,0	72
S.E.C.T.	55	17	32	49	65
	55	19	30	49	51

Aceste rezultate reduc puţin din diferenţa mare găsită între concentraţiile sanguine eficiente de B_1 şi de derivaţi, în special în cazul S.E.C.T., ştiut fiind că T.P.F. — forma legată — reprezintă partea activă a vitaminei. Dar şi în aceste condiţii se păstrează superioritatea derivaţilor cercetaţi faţă de B_1.

DISCUȚIA REZULTATELOR

În ceea ce privește D.T.P., există numeroase cercetări în literatură care arată superioritatea acestui derivat față de vitamina B_1, în cazul administrării lui per orale [6—9]; în ceea ce privește însă S.E.C.T., substanță sintetizată inițial de autorii japonezi, cercetările farmacologice sînt foarte reduse [15]. Nu se găsesc în literatură studii comparative asupra toxicității sau resorbției acestor doi derivați, în așa fel încît să se poată întrevedea superioritatea unuia sau altuia în vederea întrebuințării lor în terapeutică.

Cercetările farmacologice prezentate ne-au permis în primul rînd să confirmăm intensa resorbție per orală a acestor derivați, comparativ cu vitamina B_1, manifestată atît prin nivelul sanguin crescut cît și prin raportul avantajos între indicele de toxicitate pe cale p. o. față de calea i. v.

În cazul determinărilor de toxicitate, valorile găsite pentru DL.50 ale vitaminei B_1 și D.T.P. sînt corespunzătoare datelor din literatură [13], [17]; de asemenea, concentrațiile de tiamină totală în sînge, găsite de noi, se apropie de cele găsite de Hioco și colab. [7], [8]. În ceea ce privește S.E.C.T., datele din literatură se referă numai la nivele sanguine la iepuri și om, care și în cazul autorilor japonezi sînt mult mai ridicate decît cele obținute după administrarea unor doze egale de vitamină B_1 [15].

Urmărind raportul între concentrațiile sanguine găsite în cazul administrării S. E. C. T. și D. T. P. la șobolan, reiese superioritatea S.E.C.T. și posibilitatea obținerii unor nivele sanguine de cca 6 ori mai mari cu această substanță, comparativ cu D. T. P. Trebuie însă să ținem seama de posibilitatea existenței unor diferențe între speciile de animale în ceea ce privește resorbția per orală, metabolizarea, posibilitatea de esterificare etc. a acestor derivați și, din acest punct de vedere, rezultatele obținute pe șoareci (unde toxicitatea pe cale p. o. a S. E. C. T. este mai redusă ca a D. T. P.) pledează pentru o mai redusă resorbție a S. E. C. T. la șoarece decît la șobolan.

De asemenea, nu putem să transpunem direct, de la animale la om, superioritatea S. E. C. T. asupra D. T. P., întrucît există și o diferență în ceea ce privește gradul de esterificarea a celor doi derivați chiar la șobolan, D. T. P. fiind esterificat (legat) într-o proporție mai însemnată decît S. E. C. T. Cercetări ulterioare vor lămuri aceste aspecte, în vederea stabilirii valorii terapeutice a celor doi derivați pentru clinică.

CONCLUZII

1. Derivații de vitamină B_1 cu ciclu tiazolic deschis, D. T. P. și S. E. C. T., au un indice de toxicitate mai crescut decît vitamina B_1 în cazul administrării i. v., dar mai scăzut în cazul administrării p. o. la șoarece.

2. D. T. P. și S. E. C. T. determină nivele sanguine mult mai ridicate și de durată, comparativ cu vitamina B_1, în cazul administrării lor p. o. la șobolan.

3. Din cercetările efectuate la animal apar următoarele diferenţe cantitative între D. T. P. şi S. E. C. T. : toxicitatea S. E. C. T. p. o. la şoarece este mai redusă decît a D. T. P.; nivelele sanguine obţinute după administrarea p. o. a S. E. C. T. la şobolan sînt mai ridicate la toate intervalele între 45 de minute şi 24 de ore, decît după administrarea D. T. P.; la 3 ore de la administrare, S. E. C. T. sub formă legată se găseşte într-o proporţie mai mică decît după administrarea D. T. P.

4. Derivaţii de tiamină cu ciclu tiazolic deschis, D. T. P. şi S. E. C. T., derivaţi de vitamină B_1 cu eficacitate egală, dar cu resorbţie superioară în cazul administrării lor per orale, apar ca substanţe de largă perspectivă pentru viitor, atît ca medicamente de uz uman, care permit o administrare eficientă, dar mai lesnicioasă (p. o.) de vitamină B_1 cît şi ca biostimulatori pentru uz zooveterinar, realizîndu-se din acest punct de vedere concentraţii mari de vitamină în hrană (furaje).

Prezentată la redacţie
la 19 mai 1966

Secţia de farmacodinamie, Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Y. Cohen, A. Uzan, G. Valette, *Thiamine et dithiopropylthyamine. Étude de leur métabolisme par marquage au Soufre*[35] *chez la souris et le rat*, Bioch. Pharm., **11**, 721 (1962).
2. I. Finney, *Probit Annalysis*, Oxford Univ. Press, 1952.
3. N. Florkin, E. Stolz, *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier Publ., **11** (1963).
4. T. E. Friedman, T. C. Kmieciak, *Thiaminbestimmung im Blut*, J. Lab. Clin. Med., **28**, 1262 (1941–43).
5. M. Fukiwara, H. Watanabe, *Allilthiamine, a newly found compound of Vitamin* B_1, Proc. Japan. Acad., **28**, 156 (1952).
6. B. Gauthier, R. Tixier, A. Uzan, *Sur les thiamines à cycle thiazolique ouvert. Étude de la 0,5-diacétylthiamine*, Ann. Ph. Fr., **21**, 655 (1963).
7. D. Hioco, R. Tixier, A. Uzan, *L'étude biochimique de la dithiopropylthiamine*, Bull. Soc. Chim., Biol., **41**, 1075 (1959).
8. D. Hioco, R. Tixier, A. Uzan, R. Thévenot, *La transformation in vivo de la dithiopropylthiamine en cocarboxylase.*, Compt. Rend. Ac. Sci., **248**, 2138 (1959).
9. A. Ichibagase, *Clinical studies on thiamine derivatives*, Fuknoka-Igaku Zasshi, **48**, 1413 (1957); Chem. Abstr., **52**, 7545 (1958).
10. E. Katsura, A. Nakamura, M. Fukuda, S. Kobayashi, I. Kusama, K. Obata, *Allithiamine and its derivatives*, Naika Hôkan, **4**,571 (1957); Chem. Abstr., **52**, 11599 (1959).
11. I. Knobloch, *Physikalisch-Chemische Vitaminbestimmungen*, V.E.B., 1963, p. 181.
12. W. Sebrell, R. Harris, *The Vitamin*, Acad. Press, New York, 1954, vol. 3.
13. H. Simonet, R. Thevenot, M. Ancloise, *Sur l'étude pharmacodynamique comparée de la thiamine et de la dithiopropylthiamine*, Thérapie, **14**, 970 (1959).
14. E. Soru, *Biochimie medicală*, Edit. medicală, Bucureşti, 1960.
15. A. Takamizawa, K. Hivai, *Studies on Pirimidine Derivatives. XX. On the studies of S-Alkoxycarbonylthamine*, Chem. Pharm. Bull., **10**, 11 (1962).
16. I. Utsumi, Kiyoshi Narada, Masayoshi Samejima, *Higher thiamine alkylsulfates*, J. Vitaminol (Kyoto), **7**, 287 (1961); Chem. Abstr., **57**, 7391 (1962).
17. G. K. Westenbrink, S. Parvé, *Manometrische Cocarboxylasebestimmung in Geweben, Blut und Hefe*, Int. Z. Vitaminforsch., **21**, 461 (1950).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 2, 173—175 (1967)

STUDIUL TOXICOLOGIC ŞI BIOCHIMIC A DOI DERIVAŢI DE VITAMINĂ B_1 CU RESORBŢIE PER ORALĂ SUPERIOARĂ TIAMINEI

NOTA 2. ELIMINAREA URINARĂ DUPĂ ADMINISTRAREA P. O. LA OM

D. WINTER, INGEBORG HÄDRICH, SANDA SAUVARD şi CORNELIA STANESCU

612.2

Rezumat. — S-a urmărit, la voluntari umani, eliminarea urinară de tiamină la 24 ore după ingestia unor doze unice de 100 mg clorhidrat de tiamină sau a unor doze echimoleculare de ditiopropil-tiamină (D.T.P.) şi S-etoxi-carbonil-tiamină (S.E.C.T.). S-au obţinut concentraţii urinare de 11—13 ori mai mari în cazul derivaţilor de tiamină cu ciclu tiazolic deschis, confirmîndu-se astfel resorbţia lor superioară pe cale p.o. faţă de clorhidratul de tiamină.

Derivaţii de vitamină B_1 cu ciclu tiazolic deschis prezintă avantajul unei resorbţii p. o. superioare faţă de clorhidratul de tiamină [7], [3], realizînd nivele sanguine şi urinare mai ridicate şi de mai lungă durată [1], [4], [7]. Într-o lucrare anterioară [8] am arătat că doi derivaţi de tiamină cu ciclu tiazolic deschis, ditiopropil-tiamina (D. T. P.) şi S-etoxi-carbonil-tiamina (S. E. C. T.), dau la şobolan, în cazul administrării p.o. a unor doze echimoleculare, nivele sanguine de 20—50 ori mai mari şi de mai lungă durată decît în cazul administrării clorhidratului de tiamină. Întrucît din cercetările pe animale reieşea că după administrarea S. E. C. T. se pot obţine la şobolan nivele de tiamină superioare chiar celor obţinute după D. T. P. şi întrucît nu există în literatură studii comparative asupra resorbţiei celor doi derivaţi de tiamină la om, în nota de faţă sînt prezentate rezultatele dozărilor urinare de tiamină la om, după ingestia unor doze echimoleculare din toate cele trei substanţe amintite.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe 6 oameni (voluntari) la care s-a urmărit eliminarea urinară pe urină totală de 24 de ore (acidificată cu HCl), după administrarea p.o. a unor doze unice de 100 mg de vitamină B_1 şi a unor doze echimoleculare de D.T.P. şi S.E.C.T.

Fiecare persoană a servit ca propriul său martor, dozîndu-se nivelul în vitamină B_1 cu 24 de ore înainte de administrare şi după administrarea produselor. Toate persoanele au primit succesiv (la interval de 7 zile) cîte o doză unică din derivaţii menţionaţi, iar trei dintre ele au primit şi o doză de vitamină B_1HCl. De asemenea, la două din persoane s-a urmărit concomitent şi nivelul sanguin la 3 ore după administrarea derivaţilor, determinîndu-se atît vitamina liberă cît şi cea legată.

Pentru dozarea tiaminei în urină s-a folosit metoda descrisă de Jones [5], care prevede trecerea prealabilă a urinei printr-o coloană de permutit, după care se efectuează reacţia tiocromului, ca şi în cazul determinărilor de tiamină din sînge [8], [2], [6]. D.T.P., S.E.C.T. şi clorhidratul de tiamină au fost sintetizate la I.C.C.F.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt prezentate nivelele urinare obţinute după administrarea unei doze de 100 mg/om clorhidrat de tiamină şi a unor doze echivalente de D. T. P. şi S. E. C. T.

Tabela 1

Nivele urinare (urina totală din 24 de ore) după administrarea derivaţilor B_1 pe cale orală

Voluntarul	Valori iniţiale	Valori obţinute după administrarea substanţelor (mg/24 ore)		
		B_1	D.T.P.	S.E.C.T.
C.S.	0,171	3,3	13,1	22,2
D.W.	0,068	1,3	18,8	20,8
S.F.	0,320	0,8	15,1	26,8
C.G.	0,264	—	12,2	15,0
I..B.	0,122	—	31,7	23,4
D.M.	0,236	—	26,4	30,1
Medie	0,197	1,7±0,064	19,5±3,2	23,0±2,1
Exprimare în % comparativ cu B_1	—	1	11,5	13,5
Eliminare % din doza administrată	—	sub 2%	cca. 20%	cca. 23%

Din aceste date reiese superioritatea evidentă a derivaţilor de B_1 faţă de clorhidratul de tiamină, obţinîndu-se pentru aceşti derivaţi o eliminare de 12-14 ori mai mare. În timp ce cantitatea de B_1 eliminată în cazul clorhidratului de tiamină este sub 2%, în cazul derivaţilor cantitatea eliminată este de 20—23%. Între derivaţii cercetaţi în ceea ce priveşte eliminarea urinară, există o diferenţă minimă, de 3%, care este statistic nesemnificativă. Pentru confirmarea acestor rezultate s-a urmărit şi nivelul de vitamină B_1 legată (activă) şi liberă, realizat în sînge la 3 ore după administrarea celor 2 derivaţi. Rezultatele sînt cuprinse în tabela 2.

Tabela 2

Nivelul de vitamină B_1 obţinut în sînge după administrarea de D.T.P. şi S.E.C.T

Substanţa	Vitamină liberă*	Vitamină legată	Vitamină totală
D.T.P.	28*	7	35
S.E.C.T.	27	9	36

* μ g/100 ml sînge.

Se observă şi în acest caz că nivelele sanguine de tiamină totală, liberă şi legată sînt foarte apropiate în cazul celor doi derivaţi.

Rezultatele noastre în ceea ce privește eliminarea urinară la om a D. T. P. și B_1 sînt apropiate de cele găsite de Hiocco și colab. [4], care a administrat de asemenea doze de 100 mg/om.

Takamizawa, administrînd 50 mg vitamina B_1 și S. E. C. T., obține după 6 ore de la administrare o eliminare urinară de 2 și, respectiv, 15% din cantitatea administrată, valori care concordă cu rezultatele noastre [7].

În literatură nu se găsesc date comparative asupra resorbției celor doi derivați la om. Rezultatele noastre confirmînd superioritatea celor doi derivați asupra vitaminei B_1, în cazul administrării p. o., dovedesc că între cei doi derivați nu există diferențe semnificative. Această constatare se verifică și în cazul celor două determinări de nivele sanguine, efectuate la doi voluntari. În acest fel, coroborînd rezultatele obținute la om cu cele obținute la șobolani [8], se constată că cei doi derivați au o modalitate diferită de metabolizare și resorbție, în funcție de specie. La șobolan, S. E. C. T. se resoarbe în cantitate de cca 6 ori mai mare decît D. T. P., în timp ce, la om, ambii derivați se resorb în cantități foarte apropiate.

CONCLUZII

1. Cantitățile de tiamină eliminată în urină la om, după administrarea p. o. a D. T. P. și S. E. C. T. sînt de 11-13 ori mai mari decît cele obținute după administrarea unei doze echivalente de vitamină B_1, dovedind resorbția superioară a celor doi derivați.

2. Introducerea în terapeutică a derivaților de tiamină cu ciclu tiazolic deschis reprezintă o îmbogățire a arsenalului terapeutic cu o formă nouă și eficientă de vitamină B_1 care, administrată p. o., permite obținerea unor concentrații mărite de tiamină, utile terapeutic.

Prezentată la redacție
la 19 mai 1966

Secția de farmacodinamie,
Institutul de cercetări chimico-farmaceutic,
București

BIBLIOGRAFIE

1. Y. Cohen, A. Uzan, G. Valette, *Thiamine et dithiopropylthyamine. Étude de leur métabolisme par marquage au Soufre*^{35} *chez la souris et le rat*, Bioch. Pharm., **11**, 721 (1962).
2. T. E. Friedman, T. C. Kmieciak, *Thiaminbestimmungen im Blut*, J. Lab. Clin. Med., **28**, 1262 (1941–43).
3. B. Gauthier, R. Tixier, A. Uzan, *Sur les thiamines à cycle thiazolique ouvert. Étude de la 0,5-diacétylthiamine*, Ann. Pharm. Fr., **21**, 655 (1963).
4. D. Hiocco, R. Tixier, A. Uzan, *L'étude biochimique du dithiopropylthiamine*, Bull. Soc. Chim. Biol., **41**, 1075 (1959).
5. I. H. Jones, *Vitamin Methods*, Acad. Press, New York, 1951, vol. 2.
6. I. Knobloch, *Physikalisch-Chemische Vitaminbestimmungen*, V.E.B., 1963.
7. A. Takamizawa, K. Hirai, *Studies on the Pyrimidine Derivatives. XX. On the studies of 5-alkoxycarbonylthiamine*, Chem. Pharm. Bull., **10**, 11 (1962).
8. D. Winter, I. Hädrich, S. Sauvard, C. Stănescu, *Studiul toxicologic și biochimic a doi derivați de vitamină* B_1 *cu resorbție per orală superioară tiaminei. Nota 1. Indicele de toxicitate pe cale p. o. și i.v. la șoarece și nivelele sanguine la șobolani*, St. cerc. biochim., **10**, (1967).

J. HENRY WILKINSON, *Isoenzymes* (Izoenzimele), edit. Spon, Londra, 1965, 150 p.

Printre monografiile biochimice ale editurii Spon din Londra, editate de profesorul Cyril Long, a apărut în 1965 monografia „Izoenzimele" de J. Henry Wilkinson, profesor de chimie clinică la Universitatea din Pennsylvania.

Volumul, de 150 de pagini, se adresează unui cerc larg de biochimişti şi biologi, şi este împărţit în nouă capitole, cu o bibliografie foarte bogată, repartizată pe capitole (50—160 indicaţii la un capitol), cu un material ilustrativ bine ales, prezentat în condiţii grafice foarte bune. Fiind prima monografie din domeniul atît de nou şi de mult cercetat al izoenzimelor, apariţia ei este deosebit de bine venită.

În ultimii 10 ani, cu ajutorul unor tehnici din ce în ce mai fine, s-a demonstrat că preparatele cristaline pure ale unor enzime nu sînt omogene, ci reprezintă amestecuri de componente cu proprietăţi şi structuri diferite. Termenul de izoenzimă a fost propus pentru a se descrie formele multiple, izodinamice, din cadrul aceleiaşi specii, ale unei singure enzime, deosebite însă între ele prin unele proprietăţi fizico-chimice. Această denumire a fost recomandată şi de Comitetul permanent pentru enzime al Uniunii Internaţionale de Biochimie. Din introducere încă, autorul arată că definirea precisă a termenului prezintă dificultăţi ; sînt prezentate pe scurt părerile contradictorii ale unor cercetători asupra aplicării termenului de izoenzime la unele categorii de enzime, fără ca autorul să ia vreo atitudine. De aceea, monografia în ansamblul ei, deşi prezintă o expunere succintă a tuturor datelor la zi asupra cercetărilor în acest domeniu, este însă lipsită de spirit critic, autorul neexprimîndu-şi punctul de vedere propriu, neaprofundînd, neconfruntînd şi nerelevînd neconcordanţa dintre unele date expuse, mulţumindu-se doar cu înşiruirea lor.

Capitolul I, care este şi introducerea cărţii, prezintă nomenclatura formelor multiple ale enzimelor şi numerotarea lor, începînd de la izoenzima cu cea mai mare mobilitate electroforetică spre anod, numerotare hotărîtă de altfel şi de Comitetul permanent pentru enzime al Uniunii Internaţionale de Biochimie.

Capitolul II, „Tehnicile de separare a izoenzimelor", prezintă foarte rezumativ tehnicile electroforetice, începînd cu consideraţii generale, continuînd cu electroforeza pe hîrtie, în bloc de amidon, pe acetat de celuloză, pe gel de agar, pe gel de amidon, pe gel de poliacril-amidă, apoi cu electroforeza pe coloană verticală şi cu tehnicile cromatografice pe schimbători de ioni celulozici, în sfîrşit cu gel-filtrarea. Sînt expuse însă numai principiile şi tehnicile de lucru ale metodelor, fără nici un fel de referire la aplicarea lor în cercetarea izoenzimelor. Excepţie face doar electroforeza pe gel de amidon, unde este dat tabelul izoenzimelor separate prin această tehnică.

Capitolul III, „Detecţia şi determinarea izoenzimelor", prezintă tehnicile de eluţie, mai ales pentru dehidrogenazele NAD- şi NADP-dependente şi pentru esteraze, apoi tehnicile de colorare, cu predominanţă „enzim-electroforeza" lui Wieme şi colorarea cu săruri de tetrazolium.

Capitolul IV, „Izoenzimele lactat-dehidrogenazice", este cel mai mare şi cel mai cuprinzător capitol al cărţii. Datele sînt prezentate în subcapitole judicios alese. Distribuţia izoenzimelor lactat-dehidrogenazice (denumite LD_1, LD_2, LD_3, LD_4 şi LD_5, după ordinea încărcării electrice negative) la diferite specii şi ţesuturi este prezentată într-un tabel. Cu excepţia unor

diferenţe mari între valorile obţinute pentru acelaşi ţesut de către cercetători diferiţi, se constată că LD_1 şi LD_2 predomină la inimă, eritrocite şi rinichi, iar LD_4 şi LD_5 în ficat şi muşchii scheletici. Sînt prezentate şi acele lucrări care demonstrează existenţa a mai mult de 5 izoenzime. Subcapitolele următoare se ocupă de compoziţia chimică a acestor izoenzime, de proprietăţile lor imunochimice, chimice şi cinetice, de prezenţa izoenzimelor în ţesuturile în creştere şi, mai ales, de aplicaţiile în diagnostic ale izoenzimelor dehidrogenazice. Importanţa dată de autor acestui capitol se evidenţiază şi prin numărul mare de indicaţii bibliografice care-l însoţesc (150). Un număr asemănător nu se mai găseşte decît la capitolul tehnicilor de separare.

Capitolul V, „Forme molecular multiple ale altor dehidrogenaze", prezintă cele două forme, mitocondrială şi citoplasmică, ale malat-dehidrogenazei şi izocitrat-dehidrogenazei, precum şi izoenzimele glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, 6-fosfogluconat-dehidrogenazei şi glutamat-dehidrogenazei.

Capitolul VI, „Izoenzimele transaminazice", prezintă lucrările asupra separării şi proprietăţilor celor două forme, mitocondrială şi citoplasmică, ale acestei enzime.

Capitolul VII, „Izoenzimele fosfatazice", după ce se ocupă de distribuţia izoenzimelor fosfatazei alcaline în funcţie de metoda întrebuinţată, trece la proprietăţile lor, prezentîndu-le foarte detaliat. O pagină este consacrată izoenzimelor fosfatazei acide.

Capitolul VIII, „Forme multiple ale esterazelor", prezintă alil-esterazele, colin-esterazele şi aril-esterazele, cu dificultăţile de clasificare ca izoenzime, cu propunerea lui Augustinsson ca termenul de izoenzimă să fie aplicat numai acelor enzime care au aceeaşi secvenţă caracteristică a aminoacizilor din centrul activ, dar diferă prin restul moleculei enzimatice.

Capitolul IX, „Diferite enzime", prezintă cîteva enzime care se pot obţine în forme multiple, ca : leucin-aminopeptidaza, creatin-kinaza, ceruloplasmina, fosfoglucomutaza, peroxidaza, ribonucleaza şi amilaza.

Ultimele cinci capitole sînt prezentări sumare şi disparate ale lucrărilor făcute în domeniile respective şi nu aduc nici un fel de lămurire asupra clasificării formelor deosebite ale aceleiaşi enzime, asupra deosebirii dintre izoenzimele lactic-dehidrogenazei şi izoenzimele majorităţii enzimelor prezentate.

În concluzie, se poate afirma că autorul a reuşit să oglindească în mod succint progresele actuale realizate în acest domeniu, dar că, cu toată împărţirea foarte ordonată a materialului pe capitole şi subcapitole, el nu reuşeşte să ordoneze şi să sistematizeze multe din problemele abordate. Monografia apare totuşi ca foarte utilă.

Cecilia Şelariu
cercetător principal
la Institutul de biochimie

E. RACKER, *Mechanisms in bioenergetics* (Mecanisme bioenergetice), Academic Press, New York and London, 1965, 259 p.

Volumul face parte din seria de monografii „Advanced biochemistry", editată de A. San Pietro. Efraim Racker este şeful secţiei de biochimie a Institutului de cercetări pentru sănătatea publică din New York, profesor de microbiologie la universitatea din acelaşi oraş şi o autoritate în domeniul biochimiei proceselor de infecţie şi metabolismului energetic.

Cartea este alcătuită din 3 părți : I. *Formarea ATF în sisteme solubile* ; II. *Formarea ATF în sisteme particulate* ; III. *Reglarea utilizării ATF în sisteme plurienzimatice.*

Există mai multe căi de producere a energiei : *1*) Fosforilarea oxidativă la nivelul substratului : într-o primă etapă substratul este oxidat fără participarea fosfatului, cu formarea unui compus intermediar cu o legătură macroergică nefosforată, iar fosfatul intră într-o a doua etapă, pentru ca ulterior să fie cedat unei molecule de ADF, cu formare de ATF. *2*) Reacțiile fosforoclastice (ruperea legăturilor C-S, C-N, C-C) : în aceste cazuri se petrece o oxidoreducere intramoleculară, energia fiind conservată la atomul de carbon mai oxidat. *3*) Deshidratarea *2*-fosfogliceratului, energia păstrîndu-se, de asemenea, la atomul de carbon mai oxidat. *4*) Fosforilarea cuplată cu transportul de electroni (fosforilarea oxidativă și fotofosforilarea).

Partea I tratează problemele legate de primele trei posibilități energogenice. O atenție deosebită se acordă rolului gliceraldehid-*3*-fosfat dehidrogenazei, enzimă cu rol central în glicoliză. Modul de acțiune a enzimei este discutat critic pe baza literaturii și a propriilor cercetări, autorul argumentîndu-și propriul mecanism, acela al oxidării substratului, *via* ester tiolic, descompus ulterior de către fosfat. Se discută fiecare etapă a reacției, arătîndu-se istoricul cercetărilor, punctele critice și experiențele cu care acestea au fost depășite. După trecerea în revistă a unora dintre proprietățile „fascinante" ale enzimei, se arată că aceasta, în interacțiune cu alți componenți ai sistemelor plurienzimatice, poate avea și proprietăți ATF-azice, de catalizare a schimbului P_i^{32}-ATF-dependent de DPN, precum și de oxidare a gliceraldehid-*3*-fosfatului la *1*, *3*-difosfoglicerat. În continuare, sînt discutate și alte cazuri de fosforilare oxidativă la nivelul substratului, ca : oxidarea acet-aldehidei la bacterii, fosforilarea oxidativă a aspart-aldehidei și oxidarea α-cetoglutaratului și a piruvatului. Expunerea faptelor experimentale este îmbogățită de considerații generale foarte interesante teoretic și metodologic (ex. deosebirea ce trebuie făcută între enzimele cu două centre active și sistemele bienzimatice ; unele reacții în care intervine CoA nu au funcții energogene, ci numai de sinteză a acetil-CoA ș.a.).

Dintre reacțiile fosforoclastice, cea mai mare importanță este acordată fosfocetolazei, esențială în biosinteza celulozei din glucoză la *A. xilinum*. Ca și în celelalte cazuri, autorul descrie istoria cercetărilor în această direcție, discutînd nu numai rezultatele obținute (căi metabolice, cinetică, substrat, cofactori ș.a.), ci și implicațiile lor (analogii, aplicații practice, terminologie ș.a.).

Prima parte a cărții se încheie cu discutarea reacției de deshidratare a *2*-fosfogliceratului, catalizată de enolază.

Partea a II-a, care tratează problema fosforilării oxidative legată de procesele de transport de electroni în ciclul Krebs, începe cu un succint istoric al problemei și cu o discuție asupra importanței localizării enzimelor, subliniindu-se problemele de principiu pe care le ridică proprietățile diferite și existența intra- și extramitocondrială a acelorași enzime.

În continuare, se analizează proprietățile componenților lanțului respirator, precum și ale flavoproteinelor și ale unor proteine structurale. Sînt considerate numai proprietățile importante pentru procesul de fosforilare oxidativă, o atenție specială fiind acordată rolului și proprietăților piridin-nucleotidelor.

Un accent deosebit este pus asupra cercetărilor cu privire la localizarea reacțiilor de fosforilare. Se precizează noțiunea de „punct de încrucișare" (*crossover point*) — treapta la care un transportor de electroni (sau un grup) devine mai redus decît în altul mai oxidat — și se arată căile pe care aceste puncte au putut fi localizate în cadrul lanțului respirator. Un loc important îl ocupă metodele de măsurare a intensității fosforilărilor în cele trei „puncte de încrucișare" și unele considerații termodinamice.

Problema reacțiilor de schimb utilizate în studiul mecanismelor fosforilării oxidative este tratată pe larg prin prisma reacțiilor : P_i-ATF ; ADF-ATF ; H_2O^{18}-P_i și H_2O-ATF. Prezența unei asemenea reacții, însă, nu dovedește neapărat existența unui substrat enzimatic intermediar

(reacția poate decurge prin intermediul complecșilor Michaelis), tot așa cum absența unei asemenea reacții nu exclude existența unui substrat enzimatic intermediar.

Reacțiile parțiale ale fosforilării oxidative, în care ATF-aza joacă rolul principal, ocupă un important loc în discuția acestui proces. Considerînd o serie de aspecte esențiale pentru înțelegerea rolului ATF-azei, autorul se oprește mai mult la trei dintre proprietățile acesteia : labilitatea enzimei la temperaturi scăzute, interacțiunea cu apa și insensibilitatea la oligomicină.

O metodă eficientă în cercetarea fosforilării oxidative a constituit-o folosirea decuplanților și inhibitorilor, pe care autorul îi împarte în 4 categorii : 1) decuplanții adevărați, care inhibă fosforilarea fără a avea însă vreun efect negativ asupra respirației sau chiar stimulînd-o (ex. dinitrofenolul) ; 2) decuplanți inhibitori, care inhibă ambele procese, micșorînd raportul P/O (ex. progesterona) ; 3) inhibitori, care acționează asupra oxidărilor numai cînd sînt cuplate cu fosforilările (ex. oligomicina) și 4) inhibitori ai oxidărilor, care blochează respirația atît în sistemele decuplate cît și în cele cuplate (ex. cianura sau antimicina).

Pentru detalierea mecanismelor fosforilării oxidative, pe lîngă cercetarea proceselor metabolice în țesuturile intacte, s-a vădit necesitatea studierii sistemelor plurienzimatice și a componentelor lor. S-a dovedit că, pe lîngă fracțiunile particulate, diferitele procese metabolice necesită și unele fracțiuni solubile. Acești factori solubili au fost grupați în două categorii : factori neproteici (Mg^{2+} , Mn^{2+} , ARN, chinonele) și factori cuplanți proteici (factorii F_{1-4} și cei ai fiecărui punct de fosforilare). Se subliniază importanța compușilor intermediari, care pot avea legături macroergice fără a conține fosfor, sau care au fosfor fără a cuprinde legături macroergice.

Această parte se încheie cu o discuție generală a problemelor ridicate de materialul expus și care nu și-au găsit încă o rezolvare satisfăcătoare : fosfatul intră înainte sau după treapta oxidativă? există intermediari macroergici distincți de catalizatorii respirației și cîți anume? care este semnificația multiplicității factorilor și intermediarilor găsiți sau presupuși a participa la fosforilarea oxidativă?

Partea a III-a este dedicată problemei deosebit de importantă a sistemelor plurienzimatice recompuse, în legătură cu procesul de fosforilare oxidativă. Evocînd complexitatea acestor sisteme și a interrelațiilor lor, autorul pune problema modului de stabilire a ordinei în desfășurarea reacțiilor și a mecanismelor de control a proceselor metabolice. Această ordine este asigurată de trei factori : 1) structurali ; 2) separarea funcțională a proceselor anabolice de cele catabolice (catalizate de enzime și sisteme plurienzimatice diferite) ; și 3) referitori la proprietățile însești ale sistemelor plurienzimatice. Din studiul acestor sisteme s-au putut degaja unele idei foarte importante pentru înțelegerea controlului metabolismului. Mai întîi, ideea că fiecare asemenea sistem are caractere originale care depind de componenții și de caracterul „*pace-maker*-ilor" lor. În al doilea rînd, introducerea unui sistem plurienzimatic competitiv poate schimba factorul limitativ și caracterul procesului. În asemenea condiții, proprietățile fizico-chimice ale enzimei, de mică importanță în cadrul propriului sistem, devin foarte importante. În al treilea rînd, s-au cîștigat elemente în cunoașterea fenomenului de lag în efectuarea ciclurilor metabolice în cadrul diferitelor procese. În fine, discutarea unor diferențe între celulele intacte și sistemele recompuse a dus la posibilitatea deosebit de importantă a cunoașterii mecanismelor de reglare a interacțiunii dintre sisteme în cadrul celulei (efectul Pasteur, efectul Crabtree, biosinteza glucidelor, interrelațiile glicoliză-ciclul pentozofosfat) și a legăturii acestora cu procesele energetice.

În continuare, autorul se referă pe larg la metodologia experiențelor și la interpretarea datelor experimentale despre metabolismul celulelor intacte și factorii limitativi ai acestora în cazul celulelor ascitice tumorale, celulelor HeLa, leucocitelor, celulelor creierului și mușchilor. În fiecare din aceste cazuri, mecanismele de autoreglare a metabolismului au anumite particularități. Se desprind însă și caractere comune, dintre care cel mai important pare să fie rolul fosfatului mineral și al echilibrului său cu ADP și ATP, ca și rolul factorilor care, acționînd asupra

sintezei sau activității enzimelor, reglează metabolismul. Prin intermediul acestora se pot induce modificări în metabolismul energetic, pe două căi : 1) reducerea efectului Pasteur și 2) stimularea acestui efect. Ultimele paragrafe cuprind o rezumare succintă a concepției autorului asupra mecanismelor de control al metabolismului energetic în celulele intacte.

Concepută pe baza lecțiilor predate în 1963 la Universitatea Cornell (Ithaca, New York), cartea este scrisă într-un stil elegant, concis, de o rară claritate, pigmentată cu citate și reflecții de un umor autentic, care, spre mirarea cititorului obișnuit cu severitatea stilului cărților de specialitate, contribuie substanțial la parcurgerea și înțelegerea mai ușoară a problemelor tratate. Ea se adresează cercetătorilor, cărora le comunică o vastă experiență de laborator, îmbinată cu un rar spirit de cercetare într-un domeniu pe cît de modern și dificil, pe atît de puțin cercetat încă. Modul de punere a problemelor nu are numai darul de a reda esențialul, dar incită la meditare și la repetarea lecturii, în urma căreia cititorul rămîne totdeauna cu un plus de cunoaștere.

V. Eșanu

Institutul de biologie al
Academiei Republicii Socialiste România,
București

R. S. NEZLIN, *Biohimiia antitel* (Biochimia anticorpilor), Izd. Nauka, Moskva, 1966, 306 pag., 42 tabele și 60 figuri.

Cartea lui R.S. Nezlin supune atenției unui public larg de cititori o problemă arzătoare a imunochimiei contemporane, pe care repetatele articole cu caracter general, publicate în ultimii ani în *Advances in Immunology*, n-au reușit să o epuizeze. Progresele însemnate realizate în domeniul biochimiei anticorpilor, și mai ales în problema structurii și biosintezei acestora, se cereau cuprinse într-o carte care să facă bilanțul critic al cercetărilor efectuate în acest domeniu. Materialul bibliografic uriaș care s-a strîns în cei 5 ani care au trecut de la apariția cărții lui Kabat și Meyer, *Experimental Immunochemistry*, devenită clasică pentru imunochimiști, a îngreunat considerabil munca autorului. El a fost pus nu numai în situația de a prezenta cercetările care i s-au părut mai reprezentative, dar și de a alege, din noianul de tehnici și metode existente, pe cele care au dat o contribuție majoră la adunarea materialului experimental, care sprijină concepțiile noastre actuale. Examinînd voluminoasa bibliografie citată de autor (1 188 trimiteri bibliografice) se constată că, pe lîngă folosirea exhaustivă a literaturii sovietice de specialitate (peste 15 % din lista bibliografică), în cartea lui N. S. Nezlin sînt citate și comentate toate lucrările apărute în ultimii ani, care au contribuit la încadrarea problemei anticorpilor în coordonate biochimice riguroase.

Împărțirea cărții, ca și conținutul unor capitole, reflectă preocupările autorului pentru anumite probleme și predilecția lui pentru unele metode de cercetare imunochimică. Cartea, divizată în 7 capitole, tratează următoarele probleme : Cap. 1. — *Metode cantitative de determinare a anticorpilor*; Cap. 2. — *Izolarea anticorpilor puri*; Cap. 3. — *Proprietățile anticorpilor*; Cap. 4. — *Structura anticorpilor*; Cap. 5. — *Biosinteza anticorpilor*; Cap. 6. — *Aspecte genetice ale anticorpogenezei*; Cap. 7. — *Teorii asupra formării anticorpilor.*

Primele două capitole înfățișează pe larg contribuția personală a autorului la problema determinării concentrației anticorpilor și a izolării anticorpilor puri. Poate fi găsită aici, descrisă

pe larg, metodica folosirii imunosorbenților la purificarea anticorpilor, așa cum a fost elaborată și perfecționată de A. E. Gurvici și de autor.

În capitolele 3 și 4, consacrate proprietăților și structurii anticorpilor, se acordă o atenție deosebită analizei structurii cu ajutorul hidrolizei enzimatice și a reducerii chimice. Este prezentată pe larg tehnica de reducere prin sulfitoliză, mai puțin cunoscută în literatură, dar aplicată cu succes de F. Franek și de autor în cercetările lor asupra participării lanțurilor polipeptidice L și H la alcătuirea zonei de combinare a anticorpilor. Aceste cercetări, publicate în 1963, sînt primele care au arătat că zona de combinare ar putea rezulta din interacțiunea ambelor lanțuri (F. Franek, R. S. Nezlin, *Folia microbiol.*, **8**, 128, 1963).

În capitolul de biosinteză a anticorpilor, pe lîngă literatura adusă la zi (martie 1966), cititorul găsește și un instructiv paragraf consacrat metodelor de cercetare, redactat cu o claritate pe care o poate realiza numai un autor cu o îndelungată experiență în acest domeniu. Aici sînt prezentate și rezultatele inedite ale autorului asupra sintezei unor microglobuline de către celulele limfatice, cercetări care pot fi folosite ca model de experiment în investigarea cu radiocarbon a biosintezei anticorpilor.

În sfîrșit, în încheierea cărții, două capitole consacrate unor aspecte genetice și teoriilor asupra anticorpogenezei permit cititorului nefamiliarizat cu terminologia de specialitate să asimileze fără efort concepțiile noi. Singurul reproș care s-ar putea face acestei părți este că simplifică și prescurtează unele aspecte teoretice, ceea ce nu dă cititorului nespecialist posibilitatea să cunoască aspectele multiple sub care se abordează și în care se prezintă problema anticorpogenezei. Considerăm că ar fi fost util să se cuprindă într-un paragraf distinct cercetările ce urmăresc soarta metabolică a antigenului în raport cu anticorpogeneza și să se completeze descrierile de metodică cu prezentarea detaliată a metodei Jerne de determinare a anticorpilor legați de celule și a metodei celulelor de difuziune, ceea ce ar fi permis celor interesați aplicarea lor nemijlocită.

Desigur că, la o carte care închide în numai 300 de pagini un material pe cît de abundent pe atît de variat, se pot întotdeauna cere completări. Important este însă faptul că, în forma pe care a conceput-o autorul, cartea permite biochimistului să-și însușească și să-și aducă la zi cunoștințele într-un domeniu care constituie chintesența imunochimiei moderne.

Victor Gheție
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România,
București

GEORGES MARÉCHAL, *Le métabolisme de la phosphorylcréatine et de l'adénosine triphosphate durant la contraction musculaire* (Metabolismul fosfocreatinei și al adenozin-trifosfatului în timpul contracției musculare), Editions Arscia, S.A., Bruxelles, Librairie Maloine S.A., Paris, 1964, 184 p., 20 fig., 33 tabl.

Această carte este o monografie care prezintă pe de o parte lucrările efectuate pînă în prezent atît de autor cît și de alți specialiști, iar pe de altă parte concluziile autorului în această direcție, ca și stadiul în care se află în prezent cercetările privind participarea fosfocreatinei și a adenozintrifosfatului la procesul biochimic al contracției musculare. Monografia prezintă un

interes deosebit, mai ales pentru cercetătorii care se preocupă de biochimia și fiziologia mușchiului striat.

Cartea este împărțită în trei părți, axate pe următoarele probleme : I. *Relațiile generale dintre metabolismul muscular și fenomenele termomecanice ale contracției* ; II. *Tehnici și metode* ; III. *Metabolismul fosfocreatinei și al adenozin-trifosfatului în tetanosul muscular.*

Dat fiind că problema energeticii musculare a constituit obiectul unor cercetări destul de intense, efectuate în ultimii 50 de ani, prima parte a monografiei, alcătuită din patru capitole, tratează despre evoluția istorică a cercetărilor consacrate acestui subiect.

În primul capitol se arată că transformările de energie din mușchi pot fi împărțite în două categorii de fenomene care pot fi cercetate : prima categorie se referă la studiul naturii reacțiilor chimice care mobilizează energia și formele în care aceasta se degajă din mușchi ; a doua categorie se referă la cercetările întreprinse pentru elucidarea mecanismului biochimic însuși al contracției musculare. Tot aici, autorul subliniază și scopul monografiei publicate, și anume acela de a se stabili un bilanț între mobilizarea energiei chimice și degajarea de energie termică și mecanică în diferite condiții experimentale.

Al doilea capitol tratează despre felul în care are loc eliberarea energiei mecanice și termice în cursul contracției musculare. Se trec în revistă principalele lucrări efectuate în acest sens și se subliniază interesul pe care-l prezintă demonstrarea experimentală a transformării reversibile a energiei chimice în energie mecanică.

Reacțiile metabolice care au loc în cursul contracției musculare constituie subiectul celui de al treilea capitol. Aici se trec în revistă, pe scurt, cele mai importante lucrări publicate de o serie de cercetători cunoscuți, ca Hill, Lundsgaard, Fleckenstein, Carlson, Mommaerts, Davies și alții. În acest domeniu există de mai mult timp o serie de controverse privind demonstrarea primului donator de energie în cursul contracției musculare ; G. Maréchal își însușește punctul de vedere al teoriei clasice.

Capitolul al patrulea, foarte scurt, se ocupă de punerea problemei de fond a monografiei. Aici se schițează liniile directoare ale experiențelor efectuate de autor pentru a obține valorile privitoare la lucrul mecanic și căldura de hidroliză a fosfocreatinei și adenozintrifosfatului.

Partea a doua a monografiei, dedicată tehnicilor și metodelor, cuprinde patru capitole în care se descriu pe larg materialul fiziologic, dispozitivele electromecanice, metodele de dozare chimică și tehnicile statistice folosite. Pentru ilustrare, sînt reproduse fotografii ale instalațiilor utilizate în experimentări. Se dau numeroase detalii asupra felului în care se face controlul stimulilor primiți de mușchi, felului în care variază lungimea mușchilor, cum se măsoară și se înregistrează tensiunea, cum se face congelarea mușchilor și, în fine, modul de programare a experiențelor. În ceea ce privește dozările chimice, se dau metodele *in extenso*, pornind de la cîntărire, mojarare și pînă la modul de dozare a fosfocreatinei și ATP-ului. Ultimul capitol al acestei părți este consacrat tehnicilor statistice de planificare a experiențelor și de analiză a rezultatelor experimentale.

Rezultatele obținute de autor și publicate într-o serie de lucrări constituie partea a treia a monografiei, alcătuită la rîndul ei din patru capitole.

Primul capitol analizează conținutul în fosfocreatină și ATP din mușchiul în repaus, în diferite situații : în funcție de așezarea mușchilor pe electrozi și de anotimpul în care au fost recoltate broaștele etc. ; în ceea ce privește variabilitatea rezultatelor, se compară valorile obținute pe diferiți mușchi ai diferitelor specii de broaște.

Catabolismul fosfocreatinei și al ATP-ului în cursul unui tetanos izometric este tratat în capitolul al doilea. Deoarece cantitatea de fosfocreatină care se consumă în cursul tetanosului depinde atît de durata totală a stimulării cît și de numărul de tetanizări, autorul divide metabolismul fosfocreatinei în metabolism stabil și extrametabolism. Sînt prezentate datele experimentale obținute în aceste două feluri de metabolism, pe două specii de broaște, în raport cu căldura de menținere

În ceea ce privește metabolismul fosfocreatinei și al ATP-ului în funcție de travaliu, capitolul al treilea prezintă datele experimentale obținute în studiul efectului travaliului pozitiv și negativ asupra acestor două substanțe. Condițiile experimentale diferite utilizate, cum ar fi contracția în tensiune constantă, în viteză constantă, folosirea unei viteze rapide sau lente de alungire a mușchiului, ca și discutarea rezultatelor obținute, care încheie acest capitol, au dus pe autor la formularea schematică a unei ipoteze privind mecanismul contracției musculare.

Ultimul capitol analizează corelația dintre fosfocreatină și ATP, ținînd seama că deși nivelul fosfocreatinei depinde de durata stimulării, numărul tetanizărilor și variațiile de lungime ale mușchilor, nivelul ATP-ului variază numai uneori, aceste variații nefiind sistematic legate de natura tratamentului aplicat mușchilor.

Monografia se încheie cu un rezumat, în limbile franceză și engleză, care sintetizează principalele concluzii extrase din ansamblul lucrărilor efectuate, cu șase tabele anexă care reproduc toate rezultatele experimentale obținute și cu o listă de 136 de indicații bibliografice.

Această carte pune la îndemîna specialiștilor care lucrează în acest domeniu o imagine închegată a rezultatelor și concluziilor obținute de autor, care se dovedește a fi un cercetător foarte metodic, meticulos și exigent. Ea trebuie salutată ca o lucrare deosebit de valoroasă, care umple un gol de mult resimțit în rîndul puținelor publicații din domeniul biochimiei musculare.

Corina Iordache

Cercetător principal la
Institutul de biochimie
al Academiei Republicii
Socialiste România,
București

P. W. DANCKWORTT, J. EISEBRAND, *Luminiszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht* (Analiza de luminescență în lumină ultravioletă filtrată), Akademische Verlagsgesellschaft Geest u. Portig, Leipzig, 1964, 328 p., 93 fig., 35 tab.

Cartea recenzată, aflată la a șaptea ediție, are în primul rînd un caracter aplicativ, rezumînd peste 2 100 de cercetări ce folosesc ca instrument de studiu analiza de luminescență în lumină ultravioletă. Ea cuprinde două părți : prima, intitulată „Metodica analizei de luminescență", este alcătuită din două capitole, iar a doua, „Domeniile de aplicare ale analizei de luminescență", se împarte în zece capitole.

În capitolul I al primei părți, sînt prezentate în detaliu diferite tipuri de filtre și surse de lumină ultravioletă.

Capitolul al II-lea are două subcapitole. În primul subcapitol se tratează probleme legate de analiza calitativă. Se trec în revistă factorii de care depinde realizarea unor observații optime, ca : sticla folosită în construcția părții optice a aparaturii, tipul de solvenți folosiți, pH-ul, temperatura, substanțele străine din soluție. De asemenea, se evidențiază rolul pe care îl au puritatea obiectului cercetat, mărimea cristalelor, lungimea de undă a luminii excitante. Acest subcapitol este completat cu indicații privind realizarea practică a observațiilor calitative.

Al doilea subcapitol are ca subiect cercetarea cantitativă a fenomenelor de fluorescență. Sînt comentate procedeele de determinare a intensității luminoase a spectrelor de fluorescență prin valori absolute sau relative și se descrie aparatura folosită în analiza cantitativă, împreună

cu instrumentele de măsură respective (optice, fotoelectrice, fotografice). În continuare, se examinează importanța diferiților parametri pentru realizarea unor determinări exacte, cum ar fi : unghiul pe care fascicolul luminii de fluorescență îl face cu traiectoria luminii incidente, concentrația soluției substanței de analizat, cuantumul de lumină absorbită, lungimea de undă a radiației excitante, pH-ul și prezența unor substanțe organice sau anorganice. Pe lîngă fluorescența soluțiilor, în manual este tratată și analiza fluorescentă a agregatelor solide și aplicarea ei în cromatografia pe hîrtie, pe coloană și în strat subțire. Tot aici este prezentată și o altă aplicare a fenomenelor de fluorescență și anume efectuarea de măsurători de absorbție a luminii în ultraviolet, cu ajutorul acestor fenomene.

Partea I a cărții se încheie cu descrierea tehnicilor de redare fotografică a imaginilor de fluorescență, relevîndu-se marea importanță a acestora în diferite domenii de cercetare (botanică, medicină, chimie judiciară).

În partea a II-a sînt prezentate ramurile tehnico-științifice în care este aplicată analiza de luminescență. Se enumeră, de exemplu, substanțele anorganice cu fluorescență proprie, ca și numeroase reacții de fluorescență pentru recunoașterea diferitelor elemente. Se tratează apoi luminescența mineralelor, perlelor și pietrelor prețioase și importanța luminescenței pentru mineralogie, paleontologie etc. De asemenea, sînt descrișii numeroși compuși din seria hidrocarburilor aromatice, produși de substituție a acestora, combinații heterociclice, coloranți ; se dau indicații privitoare la analiza de fluorescență a diferitelor droguri și produse farmaceutice. Se trec apoi în revistă numeroase cercetări de botanică ce folosesc ca instrument de investigație această metodă. În domeniul biologiei și al medicinii, autorii prezintă o serie de lucrări făcute pe țesuturi și organe animale, pe lichide biologice, pe microorganisme. Sînt citate experiențe de dozare a vitaminelor, hormonilor, porfirinelor și a altor substanțe cu importanță biologică. În continuare sînt prezentate ramurile tehnice în care analiza de fluorescență are o largă aplicabilitate : industria fermentativă, fabricarea hîrtiei, industria textilă, industria coloranților, a lacurilor și materialelor plastice, industria materialelor refractare și a sticlei, industria petrolului ; apoi sînt descrise o serie de analize efectuate pe alimente de origine animală, pe uleiuri și grăsimi, vinuri, apă potabilă, produse zaharoase, fructe, legume, produse de panificație. De asemenea, se descriu diferite experiențe folosite frecvent în chimia judiciară. În ultimul capitol al părții a II-a sînt citate lucrări de cercetare muzeistică (ceramică, pictură, sculptură etc.), ce folosesc ca instrument de investigație analiza de luminescență.

Într-un apendice sînt descrise în detaliu metode de dozare cantitativă a staniului, chinolinei, tiaminei, riboflavinei. Cartea se încheie cu o bibliografie bogată în care sînt consemnate lucrările apărute pînă în 1963, precum și cu o listă de substanțe fluorescente și solvenți. Un indice alfabetic ușurează mult consultarea cărții.

Datorită modului judicios de alcătuire, sistematizării raționale a materialului prezentat, numeroaselor tabele și ilustrații, cartea este de un real ajutor cercetătorilor care folosesc ca metodă de lucru analiza de luminescență.

Mușolan Constanța
Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România,
București

MŰSZAKI DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1963

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

1967 MAJ 24

LUCRĂRI APĂRUTE IN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMANIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA. **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25×17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25×17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies**, 1965, 25×17.50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50×21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 10, NR. 2, P. 91 — 186, BUCUREŞTI, MAI 1967

I. P. „Informaţia" — c. 5125

43316

Lei 12.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 10
1967

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 10, nr. 3, p. 187—298, Bucureşti, iulie 1967

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 48 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134—135, Bucureşti, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

ADRESA REDACŢIEI:

Bucureşti, *Str. Docenţilor nr. 20,*
Raionul 30 Decembrie

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 10 (1967) Nr. 3

SUMAR

Pag.

I. BRAD, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota VI. Studiul comparativ al conţinutului de proteină brută (azot total) la cerealele de toamnă în timpul iernii 189

M. CÂRSTEANU, A. POPESCU, Exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din exocolul uterin în stare normală şi patologică 199

N. ŞT. CHIŞIU, Absorbţie intestinală de componente antigenice în tulburări digestive consecutive denutriţiei 205

V. DANKANITS, T. LÁSZLÓ, Influenţa diferitelor sisteme tampon asupra activităţii lipazei din floarea-soarelui 211

I. DINU, Studiul dinamic al capacităţii de restabilire a şobolanului alb după distrofia maidică experimentală 217

M. FURNICĂ, Caracterizare spectrofotometrică a ADN după iradiere *in vivo*. I. Comportarea faţă de acţiunea unor agenţi denaturanţi (căldură, acizi, alcali) 227

I. GONŢEA, M. ANDREI, D. POPESCU, GH. WASERMAN, Influenţa sulfocarbonismului cronic asupra unor aspecte ale metabolismului lipidic la şobolani 239

P. IONESCU, Evoluţia conţinutului de azot total şi proteic din struguri şi diferite posibilităţi de exprimare 247

A. KAPRI, Cromatografia aminoacizilor din lichidul folicular şi serul sanguin de suidee 257

O. MAMULEA, F. TOCILESCU, Determinarea ureei sanguine prin metoda enzimatică cu urează. 267

S. MIHĂESCU, V. GHEŢIE, Variaţii individuale în producerea anticorpilor precipitanţi la cobaii inoculaţi cu γG-globulină sau proteine serice de iepure. Studiu imunoelectroforetic 273

EUG. PĂUNESCU, R. MUŞĂŢEANU, M. STOINESCU, C. ZAHARESCU, Reactivitatea biochimică şi imunologică a macrofagului histioid în tuberculoză. V. Acţiunea unor antigene micobacteriene asupra structurilor lizosomale ale macrofagului histioid de la animalul normal şi vaccinat B.C.G. 279

M. ŞERBAN, Biochimia comparată a proteinelor cerebrale 287

RECENZII 293

St. cerc. biochimie, tomul 10, nr. 3, p. 187–298, Bucureşti, iulie 1967

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 189–1979 (1967)

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR DOKUMENTÁCIÓS OSZTÁLY

CONTRIBUŢII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENŢEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

Nota VI. STUDIUL COMPARATIV AL CONŢINUTULUI DE PROTEINĂ BRUTĂ (AZOT TOTAL) LA CEREALELE DE TOAMNĂ ÎN TIMPUL IERNII

I. BRAD

577.12

Rezumat. — Sînt prezentate rezultatele obţinute la analiza conţinutului de proteină brută (azot total) din nodul cu hipocotil şi frunza de secară, de grîu şi de orz, cultivate pe teren neîngrăşat şi, în aceleaşi organe, la orzul cultivat pe terenuri îngrăşate diferenţiat, cu îngrăşăminte fosfatice, potasice sau azotate în exces.

Determinările au fost executate trei ani consecutiv, cu temperaturi medii şi volum de precipitaţii diferit. Analiza comparativă a rezultatelor a dus la concluzia că există o relaţie inversă între conţinutul de azot total şi rezistenţa la ger şi o relaţie directă între raportul zahăr total/proteină brută şi rezistenţă. Unele diferenţe mici între variante, precum şi cîteva excepţii sugerează asocierea determinării conţinutului de azot total cu alte determinări, pentru o mai bună triere şi înţelegere a rezistenţei.

În monografia referitoare la rezistenţa plantelor, Levitt [21] citează un număr mare de autori care au analizat azotul neproteic şi constată că părerile sînt foarte împărţite în ceea ce priveşte existenţa unor corelaţii directe, inverse sau a nici unei corelaţii între rezistenţa la ger şi azotul neproteic. În ceea ce priveşte efectul îngrăşămintelor cu azot, cele mai multe lucrări constată un efect negativ asupra rezistenţei la ger. În unele cazuri însă, îngrăşămintele cu azot au provocat o creştere a rezistenţei la ger sau nu au avut nici un efect negativ [1–4], [14], [21], [35], [37].

Asupra enzimelor proteolitice, frigul are un efect de activare (Fielschmann) [12], [13], iar activitatea lor este mai mare la plantele mai puţin rezistente [21]. Blagoveşcenski afirmă că la scăderea temperaturii predomină proteoliza şi dezaminarea [5]. În ceea ce priveşte conţinutul de proteină brută (azot total) se observă aceeaşi contradicţie ca şi în cazul rezultatelor referitoare la azotul neproteic. Iuhimciuk [20] la trifoi şi Tavadze [32] la lăstarii de viţă de vie găsesc o oarecare corelaţie între rezistenţa la ger şi conţinutul de azot total. Biglov [4] subliniază că raportul zahăr/proteină totală este important la grîu. Giosan [15] nu constată la grîu o legătură între conţinutul de proteină totală şi rezistenţa la ger.

După Petrucioli [25], [26] și Poluşciuk [27], conținutul de proteină totală ar crește în timpul iernii. Blagoveşcenski (1955) nu constată această variație. Proteinele solubile în apă, în soluții saline și legate covalent cu glucidele ar crește cu rezistența la ger [19], [21], [31], [36], [33]. Siminovitch și Briggs [28], [29] constată electroforetic creșterea conținutului a două fracțiuni din cinci la scăderea temperaturii.

În nota de față se prezintă rezultatele obținute la determinarea conținutului de azot total (proteină brută), precum și valorile raportului zahăr total/proteină brută la nodul cu hipocotil și frunza de secară (Petkus) — specia cea mai rezistentă, grîu (A—15) și orz (Cenad 396) — specia cea mai puțin rezistentă, cultivate pe teren neîngrășat, precum și la orzul (Cenad 396) cultivat pe teren îngrășat diferențiat cu îngrășăminte fosfatice, potasice sau azotate în exces. Diferențele de rezistență la ger sînt mari între speciile, plantele nutrite diferențiat sau organele analizate de noi. Am considerat că dintr-un asemenea ansamblu, negăsit de noi în literatură, se vor putea trage concluzii care să aducă unele clarificări în problema relației dintre rezistența la ger și conținutul de proteină brută.

MATERIAL ȘI METODE

Indicațiile referitoare la alegerea variantelor, recoltarea probelor, pregătirea lor etc. s-au dat în lucrările prezentate anterior [6—10]. În materialul conservat prin uscare s-a dozat conținutul de proteină totală după metoda Kjeldahl [11], [30]. Graficele cu precipitațiile și variațiile de temperatură sînt prezentate în prima lucrare a seriei [6].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analizîndu-se comparativ conținutul de proteină brută (azot total) din frunză față de cel din nodul cu hipocotil (tabelele 1 și 2), se constată fără nici o excepție un conținut mai mare în frunze, situație inversă față de conținutul de zaharuri [10] și activitatea peroxidazei [8], dar asemănătoare cu conținutul de vitamină C [6] și activitatea catalazei [7]. Ținînd seama de faptul că frunza este mai puțin rezistentă la ger, ar rezulta din această comparație că un conținut mare de proteine nu este favorabil rezistenței la ger. Este adevărat că diferențele nu sînt mari, dar sînt constante. Diferențele însă se măresc procentual dacă se ia în considerație raportul dintre zahărul reducător total și proteina din perioadele friguroase. Un calcul sumar arată că aceste diferențe pot ajunge pînă la 200—400%, ca, de exemplu, la 14. XII. 1959 și la 20. XII. 1960. Aceste constatări arată că un conținut mai mic de substanțe proteice are semnificația unei rezistențe mai mari la ger, mai ales dacă este însoțit și de un conținut mare de zaharuri, substanțe care protejează proteinele, opunîndu-se proceselor de denaturare.

Dacă aceste constatări s-ar reproduce și la compararea rezultatelor între aceleași organe la diferite specii sau variante agrotehnice, între perioadele friguroase și cele mai puțin friguroase și între ani diferiți ca temperatură medie, s-ar putea deduce că un conținut mai mic de proteină brută constituie o caracteristică favorabilă rezistenței la ger pentru orice celulă, indiferent de organ, soi, specie, gen etc.

Tabela 1

Variația conținutului de proteină brută în nodul cu hipocotil și frunza de secară, grîu și orz (în g % s. u.) 1958-1961

Data	Frunză			Nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
1.XII.1958	26,13	27,04	28,86	24,53	20,80	26,34
15.XII.1958	24,20	25,28	25,67	23,83	20,22	24,20
3.I.1959	25,34	25,70	25,53	24,69	19,23	22,50
1.I.1959	27,82	27,86	28,70	23,82	21,55	24,82
23.I.1959	29,07	28,27	28,34	25,17	21,92	24,50
28.I.1959	28,26	27,20	28,64	24,49	23,14	25,31
28.II.1959	25,12	28,76	28,10	24,09	22,29	24,04
26.II.1959	26,48	29,74	27,02	23,40	24,06	24,43
7.III.1959	26,90	27,18	27,61	24,13	21,64	24,40
10.III.1959	26,92	31,24	28,38	27,16	22,60	25,14
23.III.1959	29,45	34,50	32,41	31,29	31,18	29,19
8.IV.1959	22,69	30,51	27,17	18,99	26,13	26,31
14.XII.1959	32,66	31,69	33,29	26,53	21,63	26,36
29.XII.1959	30,98	28,26	31,68	25,46	20,56	24,76
28.I.1960	34,56	32,11	34,91	26,74	22,23	22,28
11.II.1960	31,24	31,85	34,40	28,75	23,63	29,84
24.III.1960	32,38	31,03	34,57	27,40	22,00	28,16
15.IV.1960	31,24	28,70	31,19	21,88	26,43	28,26
21.XII.1960	34,07	30,94	34,92	23,41	18,00	21,88
12.I.1961	29,54	30,10	31,85	18,62	18,95	19,98
26.I.1961	30,57	32,25	33,29	18,87	20,83	22,20
8.II.1961	29,86	36,76	33,37	23,64	20,16	24,06
22.II.1961	30,40	31,80	33,35	21,32	19,56	21,95
16.III.1961	34,13	31,97	33,21	31,17	26,22	29,13
7.IV.1961	28,16	36,26	35,60	20,42	20,81	21,30

Tabela 2

Variația conținutului de proteină brută în frunza și nodul cu hipocotil de orz, însămînțat pe teren neîngrășat sau îngrășat cu NPK în diferite proporții (în g% s. u.) 1958-1961

Data	Frunza						Nod cu hipocotil					
	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333
12.XII.1958	28,50	—	29,16	28,04	27,48	—	26,20	—	27,30	26,14	26,98	—
23.XII.1958	29,00	—	29,01	29,78	29,88	—	25,80	—	26,58	25,83	26,14	—
3.I.1959	25,53	—	25,41	26,01	25,70	—	22,50	—	23,31	21,69	22,45	—
12.I.1959	29,20	—	29,39	29,52	28,98	—	24,20	—	24,49	24,53	24,47	—
18.II.1959	28,10	—	30,40	30,25	28,91	—	24,04	—	25,93	24,72	24,05	—
26.II.1959	27,02	—	28,10	29,72	27,91	—	24,43	—	25,40	24,43	23,46	—
7.III.1959	27,96	—	28,70	28,36	27,80	—	24,76	—	25,59	24,84	24,40	—
19.III.1959	31,15	—	33,66	30,86	31,56	—	26,73	—	30,03	26,81	27,09	—
23.III.1959	32,41	—	31,03	30,07	31,70	—	29,15	—	29,47	24,72	24,72	—
8.IV.1959	27,17	—	33,24	27,03	24,23	—	26,34	—	23,31	19,13	18,62	—
14.XII.1959	32,29	35,02	36,51	35,54	35,81	35,72	26,36	27,49	28,54	26,79	25,39	28,83
29.XII.1959	31,68	29,75	32,20	32,04	29,31	31,76	24,76	23,63	23,45	22,49	23,28	24,59
28.I.1960	34,91	35,26	35,26	34,39	35,88	35,70	22,26	25,55	29,53	29,14	28,19	30,05
11.II.1960	32,82	32,63	34,80	33,47	33,80	34,00	25,81	26,63	28,20	27,00	26,50	28,42
24.III.1960	35,48	36,75	36,40	36,45	36,80	37,80	35,00	34,56	34,04	34,65	33,86	34,04
17.IV.1960	31,19	31,44	35,43	33,73	32,58	33,86	28,26	29,05	33,51	26,25	28,79	33,95
21.XII.1960	34,92	35,79	36,39	35,87	36,08	35,88	21,88	24,78	26,66	24,82	24,51	24,59
12.I.1961	31,85	32,45	35,18	33,47	32,71	35,18	19,98	21,26	20,92	18,89	20,32	22,12
26.I.1961	33,49	34,08	34,80	34,16	33,98	34,80	22,20	21,56	23,48	22,63	21,80	23,05
8.II.1961	33,37	33,21	34,08	33,73	33,70	33,42	24,06	24,93	25,99	24,20	24,48	22,69
22.II.1961	33,36	33,27	34,79	34,09	33,72	34,81	21,95	23,27	24,08	22,90	22,56	23,44
16.III.1961	33,51	35,21	36,67	36,11	37,26	37,11	29,13	30,55	32,29	31,15	30,30	33,47
7.IV.1961	27,60	27,49	30,56	26,16	27,01	30,43	19,90	18,55	23,58	21,34	20,56	25,40

Din analiza comparativă a rezultatelor între secară, grîu şi orz (tabela 1) se constată că, la frunza de secară, conţinutul de proteină brută este mai mic decît în frunza de grîu, iar la aceasta este în marea majoritate a cazurilor mai mic decît la orz.

Dacă se ia în consideraţie raportul zahăr total/proteină brută, aranjarea este mai riguroasă. Raportul cel mai mare se constată la secară, iar cel mai mic la orz, diferenţele între specii fiind substanţiale (tabela 3). Constatăm din nou că cel mai mic conţinut de proteină brută se constată la planta din specia cea mai rezistentă. Totuşi, diferenţele sînt mai mici decît cele care ar fi de aşteptat în raport cu rezistenţa. Raportul zahăr/proteină brută accentuează însă diferenţa, ca şi în cazul comparaţiei făcute între frunză şi nodul cu hipocotil, la oricare dintre variante. Este astfel scos în evidenţă şi mai mult faptul că o micşorare a conţinutului de proteină brută nu înseamnă şi o creştere mare a rezistenţei la ger, dacă această scădere nu este însoţită şi de creşterea conţinutului de glucide. Totodată, aceste rezultate ne avertizează că nu trebuie să ne aşteptăm obligatoriu la o diferenţă în ceea ce priveşte conţinutul de proteină brută de fiecare dată cînd există diferenţă în ceea ce priveşte rezistenţa la ger.

Din analiza tabelei 1 reiese că în nodul cu hipocotil conţinutul de proteină brută este cel mai mare la orz, dar nu este cel mai mic la secară. Şi pentru raportul zahăr total/proteină brută se constată aceeaşi ordonare (tabela 3). Cea mai puţin rezistentă plantă şi-a păstrat însă locul stabilit prin compararea valorilor la frunză.

Ultimele rezultate nu desfiinţează valabilitatea concluziilor mai sus formulate, ci numai aduc în discuţie aspecte noi. Din cercetări proprii * şi din lucrările lui Gheţie şi Buzilă [16], Hodges [19], Suleimanov [31], Ulrich [33], Zeeh şi Pauli [36], noi am dedus tendinţa de heteroproteidizare în cazul unei rezistenţe mai mari, fenomen prin care se micşorează numărul de grupări denaturabile prin frig şi creşte gradul de protejare a proteinelor. În acest caz, chiar dacă conţinutul de proteină brută este mai mare, nu este strict necesar un conţinut mai mare de zaharuri simple, libere. Credem că la secară cantitatea de zaharuri pe care nu o găsim după prevederile rezultate din legitatea stabilită este combinată cu proteinele, în glucoproteide, sau se găseşte sub formă de polizaharide, mucopolizaharide. Acestea pot „îmbrăca" proteinele, blocînd prin interpunere, ecranizare, şi efectul enzimelor proteolitice [17] activate de temperaturile scăzute [13], [14]. Se micşorează astfel proteoliza [5], care este mai puternică la plantele nerezistente, din cauza activităţii mai mari a enzimelor proteolitice [21].

Datorită creşterii activităţii enzimelor proteolitice, era de aşteptat creşterea conţinutului de aminoacizi liberi, care a fost semnalată în timpul iernii de unii autori [32]. Noi am constatat că, deşi la secară conţinutul de proteină brută este mai mare decît la grîu în nod, totuşi conţinutul în aminoacizi liberi este mai mare la grîu decît la secară, fiind cel mai mare la orz*. Faptul că la secară nu se găseşte cel mai mare raport zahăr/proteine s-ar putea explica şi prin variaţia nesistematică a azotului neproteic cuprins în proteina brută dozată (tabela 4).

Faţă de datele noastre, considerăm necesar să amintim constatările altor autori [21], prin care se face dovada că protecţia nu se realizează

* Lucrare nepublicată.

Tabela 3

Variația raportului zahăr reducător total/proteină în frunza și nodul cu hipocotil de secară, grîu și orz (1958–1961)

Data	Frunză			Nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
11.XII.1958	1,18	1,04	0,92	1,30	1,67	1,20
15.XII.1958	1,30	1,10	0,94	1,35	1,68	1,21
3.I.1959	1,00	0,86	0,73	1,15	1,61	1,32
23.I.1959	0,92	0,79	0,69	1,16	1,48	1,18
28.I.1959	1,11	1,06	0,84	1,38	1,45	1,20
16.II.1959	1,31	0,85	0,65	1,38	1,49	1,34
19.III.1959	0,65	0,35	0,41	0,59	0,45	0,56
23.III.1959	0,72	0,34	0,32	0,60	0,33	0,57
8.IV.1959	0,88	0,35	0,66	1,07	0,84	0,91
14.XII.1959	0,58	0,46	0,32	1,00	1,21	0,57
28.XII.1959	0,75	0,78	0,49	1,50	1,59	1,21
28.I.1960	0,71	0,66	0,51	1,17	1,48	1,37
11.II.1960	0,76	0,76	0,60	1,14	1,41	1,06
24.III.1960	0,52	0,38	0,33	0,49	0,68	0,48
15.IV.1960	0,71	0,53	0,50	0,67	0,53	0,62
20.XII.1960	0,39	0,45	0,24	1,02	1,38	1,02
11.I.1961	0,65	0,65	0,44	1,55	1,65	1,31
26.I.1961	0,60	0,59	0,47	1,52	1,24	0,79
8.II.1961	0,94	0,56	0,46	1,40	1,21	1,10
22.II.1961	1,05	0,55	0,49	1,66	1,64	1,59
16.III.1961	0,51	0,39	0,35	0,43	0,50	0,60
7.IV.1961	0,40	0,33	0,32	0,87	0,79	0,21

Tabela 4

Variația raportului zahăr reducător total/proteină în frunza și nodul cu hipocotil de orz însămînțat pe teren îngrășat cu NPK în diferite proporții (1958–1961)

Data	Frunză			Nod cu hipocotil		
	$N_3P_1K_1$	$N_1P_3K_1$	$N_1P_1K_3$	$N_3P_1K_1$	$N_1P_3K_1$	$N_1P_1K_3$
12.XII.1958	0,74	0,80	0,86	1,17	1,29	1,27
3.I.1959	0,74	0,74	0,78	1,17	1,33	1,28
12.I.1959	0,67	0,73	1,01	1,18	1,24	1,22
25.II.1959	0,56	0,57	0,66	1,12	1,16	1.20
7.III.1959	0,31	0,35	0,39	0,41	0,44	0,42
8.IV.1959	0,52	0,50	0,70	1,04	1,29	1,47
14.XII.1959	0,26	0,30	0,26	0,62	0,70	0,79
29.XII.1959	0,34	0,40	0,54	1,22	1,33	1,25
28.I.1960	0,45	0,40	0,48	0,99	1,09	1,04
11.II.1960	0,54	0,57	0,57	1,07	1,11	1,14
24.III.1960	0,37	0,35	0,33	0,48	0,55	0,56
17.IV.1960	0,42	0,43	0,45	0,34	0,35	0,35
20.XII.1960	0,24	0,26	0,24	0,56	0,76	0,73
11.I.1961	0,25	0,30	0,33	1,11	1,42	1,40
26.I.1961	0,44	0,50	0,52	0,74	0,81	0,90
8.II.1961	0,47	0,43	0,44	1,00	1,17	1,26
22.II.1961	0,39	0,40	0,40	1,31	1,25	1,25
16.III.1961	0,30	0,30	0,29	0,44	0,47	0,47
7.IV.1961	0,37	0,59	0,56	0,86	1,33	1,40

numai în funcţie de concentraţia în zaharuri, ci şi de labilitatea proteinei. Pentru a dovedi aceasta, s-a lucrat cu suc de plantă călită şi necălită, care conţinea mai puţine zaharuri. Pentru a evita denaturarea proteinelor la scăderea temperaturii, a trebuit să se adauge o cantitate mai mare de zaharuri decît cele existente în sucul călit supus aceloraşi probe. Pe de altă parte, cercetările făcute de Gheţie şi Buzilă [16] ne-au dus la concluzia că crioproteinele constituite din cenapse lipoproteice determină, prin crioprecipitare, delimitarea în celule a unor zone privilegiate, care includ formaţiuni celulare importante în procesul de regenerare şi în procesele de schimb energetic. Aceste zone credem că au un regim aparte în ceea ce priveşte activitatea unor enzime, concentraţia unor substrate, conţinutul în substanţe cu acţiune specială şi schimbul de energie. Prin aceasta se aduce în discuţie şi problema distribuirii holo- şi heteroproteidelor în celulă.

Comparînd rezultatele obţinute la variantele agrotehnice (tabela 2), se constată că conţinutul de proteină brută este mai mare la varianta cu azotat de amoniu şi mai mic la variantele cu superfosfat şi sare potasică în exces. Aceste constatări confirmă încă o dată concluzia că un conţinut mai mic de proteină brută şi un raport zahăr total/proteină brută mai mare constituie condiţii metabolice favorabile rezistenţei la ger. Această constatare este şi mai clară la nodul cu hipocotil al plantelor din aceleaşi variante. Pentru frunză, acest fenomen se observă mai evident în anul 1958—1959, care a fost cel mai friguros. Deoarece efectele datorite acestei îngrăşări diferenţiate nu se rezumă în mod sigur numai la modificarea procentuală a conţinutului de proteină totală, ci se reflectă şi în raportul diferitelor fracţiuni protidice, se ajunge la concluzia că dozarea azotului total prin metoda Kjeldahl este necesară, dar trebuie completată cu determinarea diferitelor fracţiuni care conţin azot. Astfel, şi cercetările noastre au dus la constatarea că în ceea ce priveşte conţinutul de aminoacizi liberi diferenţele sînt cu mult mai mari decît cele constatate la determinarea de proteină brută*.

Dacă se compară rezultatele diferiţilor ani de cercetare, se constată că o dată cu creşterea temperaturii medii a anilor, din 1958 către 1961, creşte şi procentul de proteină totală şi scade raportul zahăr total/proteină brută. Totodată scade conţinutul de zaharuri în nod şi în frunze [9], scade conţinutul de vitamina C [6] în nod, în timp ce activitatea catalazei creşte [7]. Aceste modificări semnifică micşorarea rezistenţei la ger, conform concluziilor marii majorităţi a cercetătorilor. Această micşorare a rezistenţei a fost observată şi de noi şi s-a manifestat prin creşterea gradului de lezare a frunzelor la toate variantele. La orz, şi anume în mod deosebit la varianta $N_3P_1K_1$, s-a constatat degerarea unui număr apreciabil de plante. Aceste constatări pledează în favoarea concluziei că provocarea creşterii conţinutului de azot total, nu numai prin îngrăşarea cu cantităţi mari de azot, ci şi prin creşterea temperaturii şi a precipitaţiilor, induce o rezistenţă mai mică la ger.

Dacă se urmăreşte variaţia conţinutului de proteină brută în decursul fiecărui an, se constată că acest conţinut scade de fiecare dată după intrarea în iarnă şi după o primă scădere mai puternică de temperatură. Astfel, la 15. XII. 1958, la 29. XII. 1959 şi la 12. I. 1961, conţinutul de

* Lucrare nepublicată.

proteină brută este mai mic față de data anterioară. De asemenea, către sfîrșitul lunii martie și începutul lunii aprilie se constată valori mai mari față de cele din lunile anterioare (tabela 1). Concluziile sînt asemănătoare cu cele ce rezultă din analiza tabelei 2. Aceste prime scăderi ale conținutului de proteină brută din cursul fiecăruia dintre ani sînt însoțite de creșteri apreciabile ale raportului zahăr total/proteină brută. Subliniem însă că nu am constatat, pentru întreaga perioadă de temperaturi scăzute, regularități în variația conținutului de proteină brută în funcție de temperatură.

CONCLUZII

1. Conținutul de proteină brută (azot total) este mai mare în frunză decît în nodul cu hipocotil, în frunza de orz decît în frunza de grîu, iar în aceasta mai mare decît în frunza de secară. La varianta agrotehnică cu azotat de amoniu în exces, conținutul de proteină brută este mai mare decît în variantele cu superfosfat și sare potasică în exces. De asemenea, el este mai mare în anii cu temperaturi medii mai mari și precipitații mai bogate decît în anii cu temperaturi medii mai mici și precipitații moderate, precum și la începutul perioadei de vegetație, în comparație cu primele scăderi de temperatură. Aceste constatări constituie argumente în favoarea existenței unei corelații inverse între conținutul de proteină brută și rezistența la ger.

2. Raportul zahăr total proteină brută este mai mare la nodul cu hipocotil decît la frunze, la frunzele de secară, și grîu decît la cea de orz, la variantele agrotehnice cu superfosfat și sare potasică în exces decît la varianta cu azotat de amoniu în exces. De asemenea, raportul este mai mare în anii cu temperaturi medii mai mici, cu precipitații moderate decît în anii cu temperaturi mai mari și precipitații mai bogate. Diferențele sînt mult mai mari decît cele constatate la conținutul de azot total. Aceste constatări arată existența unei corelații directe între valorile acestui raport și rezistența la ger, constituind și un criteriu mai bun de triere a plantelor.

3. Conținutul mai mic de proteină brută în nodul cu hipocotil de secară, față de cel de grîu, și diferențele uneori prea mici față de diferențele de rezistență la ger între plante arată existența excepțiilor și necesitatea ca dozarea azotului total după metoda Kjeldahl să fie însoțită în paralel de dozarea diferitelor fracțiuni protidice.

Prezentată la redacție
la 8 martie 1966

Secția de fiziologie și biochimie vegetală,
Institutul de cercetări pentru cereale
și plante tehnice, Fundulea-București

BIBLIOGRAFIE

1. Avdonin N. S., *Ustoicivosti ozimîh kultur k neblagopriatnîm usloviam perezimovki na dernovo-podzolistîh pocivah necernozemnoi polosi*, Zimost. Selskohoz. Kult., Moscova, 1960, p. 58.
2. Belkin N. I., *Biohimiceskie pokazateli zimostoikosti i sposobî borbî s ghibeliu zimuiuşcih rastenii*, Zimost. Selskohoz. Kult., Moscova, 1960, p. 15.
3. Belkin N. I., *Zimostoikosti rastenii*, Izd. Știința, Chișinău, 1961.

4. Biglov T. T., Girfanov V. K., *Vlianie mineralnogo pitania na zimostoikosti i produktivnosti ozimoi pşeniţi na serîh lesnîh pocivah başkirskogo preduralia*, Fiz. Ust. Rast., Moscova, 1960, p. 49.
5. Blagoveşcenski A.V., *Bazele biochimice ale procesului de evoluţie la plante*, Edit. agrosilvică de stat, Bucureşti, 1953.
6. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota I. Studiul comparativ al conţinutului în vitamina C la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **8**, 163 (1965).
7. Brad I., *Nota II. Studiul comparativ al activităţii catalazei la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **8**, 293 (1965).
8. Brad I., *Nota III. Studiul comparativ al activităţii peroxidazei la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **9**, 11 (1966).
9. Brad I., *Nota IV. Studiul comparativ al conţinutului de zahăr direct reducător şi total la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **9**, 249 (1966).
10. Brad I., Sotiriu V., Steroiu V., *Nota V. Studiul comparativ al activităţii dehidrazelor şi respiraţiei la cereale de toamnă în timpul iernii. Unele diferenţieri legate de potenţialul redox*, St. cerc. biochim., **9**, 32 (1966).
11. Ermakov A. I., Arasimovici V. V., Smirnova M. I., Muri I. K., *Metodi biohimiceskogo issledovaniia rastenii*, Selhozghiz, Moscova-Leningrad, 1952.
12. Fielschmann L., *Azione del freddo su alcuni aspetti biochimici ed enzimatici dei semi nel corso della germinazione*, R. Sci., **29**, 287 (1959).
13. Fielschmann L., *Idem*, R. Sci., **29**, 2 151 (1959).
14. *Fiziologhiia ustoicivosti rastenii*, Trudî Konferenţii 3—7 marta 1959, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moscova, 1960.
15. Giosan N. şi colab., *Contribuţii la studiul rezistenţei la ger a unor soiuri de grîu de toamnă în vederea raionării lor*, St. cerc. agronomie (Cluj), **X**, 49 (1959).
16. Gheţie V., Buzilă L., *Crioprecipitarea în sucurile plasmatice ale unor seminţe*, St. cerc. biochim., **7**, 47 (1964).
17. Haeringen N. L., *The influence of a sulfated polysaccharide on the activity of pepsin*, Biochemical Laboratory Germany, Sixth intern. Cong. biochem., New York, 26 iul. — 1 aug. 1964, Section IV — *Mechanism of enzymes action.*
18. Heber U., *Ursache der Frostresistenz bei Winterweizen. I. Die Bedeutung der Zucker für die Frostresistenz*, Planta, **52**, 431 (1958).
19. Hodges H. F., *Characterisation of proteins and carbohydrates associated with cold hardening in winter wheat* (*Triticum aestivum*), Dissert, Abstr., **25**, 738 (1964).
20. Iuhimciuk F. F., *Fiziologhiceskie osnovi zimostoikosti klevera*, Zimost. Selskohoz. Kult., Moscova, 1960, p. 193.
21. Levitt J., *The hardiness of plants*, Academic Press, New York, 1956.
22. Mason H. S., *Mechanism of oxygen metabolism*, Advanc Enzymol., **19** (1957).
23. Moskov I. V., *Fitofiziologhiceskoe izucenie semian pşeniţi v pokoe i pri prorastanii*. Fiz. Ust. Rast., Moscova, 1960, p. 27.
24. Parker J., *Relationships among cold hardiness water soluble protein, antocyanins and free sugars in Hedera helix L.*, Plant Physiol., **37**, 809 (1962).
25. Petrucioli G., Amicucci U., *Contributo allo studio dei rapporti tra il contenuto di umidita, di zuccheri e di sostanze proteiche delle foglie dell'olivo e le variazioni della temperatura*, Ann. Sperim. Agraria, **3**, 945 (1958).
26. Petrucioli G., Amicucci U., *Idem*, Ann. Sperim. Agraria, **6**, 975 (1960).
27. Poluşciuk L. K., *Zavisimosti zimostoikosti greţkogo oreha ot pogodnîh uslovii goda*, Fiz. Ust. Rast., Moscova, 1960, p. 366.
28. Siminovitch I., Briggs D. R., *Studies in the chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to its frost hardiness. III. The validity of plasmolysis and dessiccation tests for determining the frost hardiness of bark tissue*, Plant Physiol., **28**, 15 (1953).
29. Siminovitch I., Briggs D. R., *Idem. IV. Effects of ringing on translocation, protein synthesis and the development of hardiness*, Plant Physiol., **28**, 177 (1953).
30. Sluşanschi H., *Analiza îngrăşămintelor şi amendamentelor*, Edit. agrosilvică de stat, Bucureşti, 1954.
31. Suleimanov I. G., *Nekotorîe biohimiceskie izmenenia, vliiaiuşcie na vodoobmen i morozoustoicivosti krasnogo klevera*, Fiz. Ust. Rast., Moscova, 1960, p. 140.

32. Tavadze P. G., *Vlianie agropriemov na ustoicivosti vinogradnoi lozi protiv zimnih nizkih temperatur*, Fiz. Ust. Rast., Moscova, 1960, p. 336.
33. Ulrich H., Heber U., *Über das Denaturieren pflanzlicher Eiweiße durch Ausfrieren und seine Verhinderung. Ein Beitrag zur Klärung der Frostresistenz bei Pflanzen*, Planta, **51**, 311 (1958).
34. Ulrich H., *Cold and plant metabolism*, Bull. Soc. franç. Physiol. Vég., **7**, 144 (1961).
35. Vasiliev I. M., *Zimovka rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moscova, 1956.
36. Zeeh A. C., Pauli A. W., *Cold resistance in three varieties of winter wheat as related to nitrogen fractions and total sugar*, Agron. J., **52**, 334 (1960).
37. *Zimostoikosti selskohoziaistvennih kultur*, Materiali naucinoi konferenții po voprosam zimostoikosti ozimîh zernovîh kultur i mnogoletnih trav. 14—17 ianvaria 1958, Izd. Min. Selsk. hoz. SSSR, Moscova, 1960.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 199–203 (1967)

EXOSMOZA SODIULUI, POTASIULUI ŞI CALCIULUI DIN EXOCOLUL UTERIN ÎN STARE NORMALĂ ŞI PATOLOGICĂ

MIOARA CĂRSTEANU şi ALEXANDRINA POPESCU

618.1: 541.1

Rezumat. — S-a urmărit exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din exocolul uterin, în stare normală, cu unele afecţiuni benigne şi cu cancer declarat. S-a constatat, în cazul exocolului patologic, că valorile exosmozei sodiului, potasiului şi calciului depăşesc, în majoritatea cazurilor, limita superioară a valorilor exosmozei acestor ioni din exocolul normal : exocolul diagnosticat ca avînd modificări maligne a prezentat valori ale exosmozei sodiului, potasiului şi calciului mult mai crescute decît exocolul patologic cu modificări benigne. Diferenţele dintre valorile medii corespunzătoare exosmozei acestor cationi sînt distinct semnificative ($P < 0{,}01$).

Dezvoltarea cunoştinţelor în ceea ce priveşte morfologia şi fiziologia normală şi patologică a aparatului genital feminin a făcut progrese serioase în ultimele decenii, datorită utilizării unor metode perfecţionate de investigaţie. Cu toate acestea, stabilirea malignităţii unei leziuni la nivelul colului uterin rămîne de multe ori , datorită multitudinii factorilor care concură, o problemă deschisă.

Dacă afecţiunile benigne ale exocolului uterin (eroziuni, cervicite etc.) se pot depista uneori, într-o primă fază, prin observarea macroscopică, problema cea mai importantă rămîne aceea a diagnosticării cancerului colului uterin. Aceasta cu atît mai mult cu cît unii autori [1] consideră ca leziuni precanceroase toate leziunile cronice, întrucît acestea — sub influenţa unei excitaţii îndelungate — se transformă în cancer.

Metodele de diagnosticare a stărilor funcţionale ale epiteliului exocolului uterin se bazează pe explorarea lui clinică *in situ* şi pe examinarea ţesutului prelevat. În afara metodelor anatomopatologice curente, au mai fost propuse o serie de metode biochimice, cum sînt cele bazate pe aşa-numitul test glucuronidazic [2], [3] sau pe urmărirea metabolismului celular, prin determinări manometrice ale glicolizei anaerobe [4].

Toate aceste metode însă sînt concludente numai în măsura în care una o completează pe cealaltă, iar pe de altă parte marea lor majoritate necesită o prelevare de ţesut.

În lucrări anterioare [5], [6] am urmărit procesul de exosmoză a electroliţilor din exocolul uterin, în stare normală şi patologică, cu ajutorul determinărilor conductometrice; cu cît exosmoza electroliţilor era mai intensă, cu atît conductibilitatea electrică specifică a soluţilor rezultate în urma exosmozei devenea mai mare. S-a constatat că exocolurile uterine patologice au prezentat valori ale exosmozei electroliţilor mai mari decît

exocolurile constatate normale clinic, colposcopic şi anatomopatologic. Mai mult chiar, exocolurile diagnosticate ca avînd modificări maligne au prezentat valori ale exosmozei electroliţilor cu mult mai crescute decît exocolurile patologice cu modificări benigne.

Aceste constatări ne-au îndreptăţit să ne continuăm cercetările în acest domeniu, în vederea depistării *in situ* a exocolurilor patologice, în speţă a celor neoplazice, cu atît mai mult cu cît metoda exosmozei este simplă, rapidă, exactă şi nu necesită prelevare de ţesut. De aceea, în lucrarea de faţă am urmărit exosmoza unor cationi cu rol important în activitatea funcţională celulară, în speţă a ionilor de sodiu, potasiu şi calciu, din exocoluri în stare normală, cu unele afecţiuni benigne şi cu cancer declarat, prin determinarea directă a concentraţiei lor în soluţiile rezultate din exosmoză.

Literatura de specialitate arată că, în colul uterin, conţinutul de sodiu şi apă este mai crescut decît în corpul uterin, în timp ce potasiul şi clorul sînt mai scăzute [7]. Mai mult chiar, s-a constatat că în mucusul secretat de mucoasa colului uterin cantitatea de sodiu şi clor este practic constantă de-a lungul ciclului ovarian [8]. Cercetări făcute cu calciu marcat au arătat că, la nivelul uterului, calciul ocupă exclusiv spaţiul extracelular [9].

Pe de altă parte, se ştie că celulele neoplazice sînt mai bogate în potasiu decît acelea ale ţesuturilor normale sau atinse de afecţiuni benigne [10].

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările din această lucrare s-au efectuat pe soluţiile apoase rezultate în procesul de exosmoză a sodiului, potasiului şi calciului din exocoluri normale, exocoluri cu afecţiuni benigne (eroziuni, cervicite etc.) şi exocoluri neoplazice, toate constatate clinic, colposcopic şi anatomopatologic.

Metoda utilizată a fost cea descrisă în lucrări anterioare [5], [6] : pe exocolul uterin, spălat în prealabil cu apă distilată, pentru eliminarea eventualelor secreţii, şi uscat cu un curent de aer cald, se aplică un tub de sticlă, deschis la ambele capete, lung de 20 cm şi cu diametrul interior de 3 cm ; o uşoară apăsare asigură o fixare etanşă a tubului. Se introduc apoi în tub 10 ml apă bidistilată. După 10 minute de la introducerea apei în tub, printr-o uşoară înclinare a tubului se trece lichigul într-un pahar Berzelius. În această soluţie se măsoară concentraţia ionilor de sodiu, potasiu şi calciu cu ajutorul unui fotometru de flacără. Exosmoza cationilor menţionaţi este direct proporţională cu concentraţia lor în soluţie.

În condiţiile menţionate s-au efectuat 89 de determinări, dintre care 30 pe exocoluri normale, 24 pe exocoluri patologice cu modificări benigne şi 35 pe exocoluri cu modificări maligne.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În cazul exocolurilor patologice, valorile exosmozei sodiului, potasiului şi calciului depăşesc, în majoritatea cazurilor, limita superioară a valorilor exosmozei acestor ioni din exocolurile constatate normale (tabela 1).

Din calculele noastre rezultă că diferenţele dintre valorile medii corespunzătoare exosmozei acestor cationi din exocolurile normale, cu afecţiuni benigne şi cu afecţiuni maligne sînt distinct semnificative, probabilitatea de transgresiune fiind sub 1% ($P < 0{,}01$).

În ultima coloană a tabelei 1 sînt date intervalele în interiorul cărora este de așteptat să fie cuprinse 99% din valorile individuale determinate experimental.

Limitele între care variază valorile înregistrate pentru exosmoza sodiului, în cazul exocolurilor patologice maligne, sînt situate deasupra celor

Tabela 1

Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din exocoluri normale și patologice (mg/100 ml)

Cation exosmozat	Felul cazurilor	Nr. cazuri	Limita inferioară	Limita superioară	Media (X)	Abatere medie (s)	Intervale de confidență corespunzătoare (X ± 2,68 s)
Na	Exocoluri normale	30	0,50	2,30	1,24	0,097	1,24±0,26
	Exocoluri patologice benigne	24	2,01	5,23	3,65	0,180	3,65±0,48
	Exocoluri patologice maligne	35	5,76	28,50	14,77	0,960	14,77±2,57
K	Exocoluri normale	30	0,19	1,90	0,48	0,068	0,48±0,18
	Exocoluri patologice benigne	24	0,18	2,60	1,21	0,150	1,21±0,40
	Exocoluri patologice maligne	35	2,30	7,38	4,72	0,255	4,72±0,68
Ca	Exocoluri normale	30	0,03	0,11	0,06	0,003	0,06±0,009
	Exocoluri patologice benigne	24	0,03	0,36	0,22	0,018	0,22±0,048
	Exocoluri patologice maligne	35	0,26	0,76	0,55	0,020	0,55±0,053

corespunzătoare exocolurilor patologice benigne sau normale, iar o suprapunere parțială a domeniilor de variație nu se constată decît între aceste două din urmă categorii de exocoluri. Această suprapunere este însă foarte limitată, dat fiind că, din cele 30 de cazuri normale studiate, numai 3 au prezentat valori ale exosmozei sodiului mai mari de 2,0 mg/100ml.

Pentru potasiu, valorile înregistrate în cazul exocolurilor normale au coincis, în unele cazuri, cu cele corespunzătoare exocolurilor patologice benigne, dar au rămas totdeauna dedesubtul celor înregistrate la exocolurile patologice maligne. O foarte redusă suprapunere între limitele de variație ale exosmozei potasiului la exocolurile patologice benigne și maligne s-a manifestat într-un singur caz de exocol patologic malign, la care s-a constatat pentru exosmoza potasiului o valoare sub 2,60 mg/100ml.

Constatări similare s-au făcut și în ceea ce privește exosmoza calciului, cu mențiunea că numai în 2 din cele 35 de cazuri de exocoluri patologice maligne s-au obținut valori mai mici de 0,36 mg/100 ml, situate sub limita superioară corespunzătoare exocolurilor patologice benigne.

Repetarea determinărilor la unele din aceste exocoluri, la diferite intervale de timp, a indicat valori ce se încadrează între aceleași limite menționate în tabela 1.

În general, la exocolurile cu modificări maligne, diagnosticate clinic, colposcopic și anatomopatologic, valorile exosmozei cationilor amintiți sînt de circa 10 ori mai mari pentru sodiu și de 4, respectiv 7 ori mai mari pentru potasiu și calciu decît limitele superioare găsite în cazurile normale.

Așa cum reiese din cele arătate, cationul de sodiu pare să fie cel mai ușor cedat, *in situ*, de mucoasa exocolului uterin pusă în contact cu apa bidistilată. Urmează potasiul, iar calciul este cel mai stabil

dintre cationii menţionaţi, fapt care se reflectă, pe de o parte, în limitele sale restrînse de variaţii în cazurile de exosmoză pe exocoluri normale, iar pe de altă parte în faptul că, şi în cazurile patologice în care variaţiile de exosmoză depăşesc aceste limite, valorile obţinute sînt totuşi foarte apropiate.

Această comportare este asemănătoare celei constatate de noi în lucrări anterioare asupra exosmozei acelorași ioni din pielea umană normală şi în diferite boli ale ei [11].

Această similitudine de comportare la exosmoză a mucoasei exocolului uterin cu aceea a pielii umane normale se manifestă şi în cazul determinărilor de conductibilitate a soluţiilor rezultate în urma exosmozei. S-a constatat şi aici că, în cazul cînd cel puţin exosmoza unuia din cationii menţionaţi creşte peste limitele normale, este depăşită totdeauna şi limita normală a conductibilităţii soluţiei; în cazurile în care sodiul, potasiul şi calciul exosmozează în limite normale, conductibilitatea soluţiilor respective se situează şi ea între limitele normale stabilite în lucrări anterioare [6].

CONCLUZII

Ţinînd seama de toate cele constatate mai sus, există o mare probabilitate de a diagnostica just exocolurile, ca fiind normale, cu modificări benigne sau cu modificări maligne, după următoarele limite între care se încadrează obişnuit marea majoritate a valorilor exosmozei sodiului, potasiului şi calciului:

mg/100 ml:	Na	K	Ca
Exocol normal	$\leqslant 2{,}0$	$\leqslant 0{,}7$	$\leqslant 0{,}1$
Exocol benign	$2 - 5{,}2$	$0{,}7 - 2{,}6$	$0{,}1 - 0{,}3$
Exocol malign	$> 5{,}2$	$> 2{,}6$	$> 0{,}3$

Datele obţinute în această lucrare ne îndreptăţesc să credem că, alături de celelalte metode cunoscute, metoda exosmozei sodiului, potasiului şi calciului din exocolul uterin poate aduce contribuţii în clinică la depistarea *in situ* a exocolurilor patologice, în special a celor neoplazice.

Prezentată la redacţie
la 11 ianuarie 1967

Institutul de Biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România
şi Maternitatea „Filantropia"
din Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. N. Petrova, *Despre acţiunea substanţelor oestrogene asupra uterului şi vaginului*, Acuşerstvo i ghinecologhia în Analele rom.-sov., **12** (1949).
2. W. H. Fishman, B. Springer, R. Baunetti, *Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood*, J. Biol. Chem., **173**, 449 (1948).
3. L. D. Odell, J. Burt, R. Bethea, *Glucuronidase activity*, Science, **109**, 564 (1949).
4. A. Limburg, *Die Frühdiagnose des Uteruscarcinoms*, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1956, p. 272.
5. E. Macovschi, Mioara Cârsteanu, Alexandrina Popescu, *Metodă pentru determinarea exosmozei electroliţilor din colul uterin*, St. cerc. biochim., **7**, 151 (1964).

6. Alexandrina Popescu, Mioara Cârsteanu, *Explorarea exocolului uterin prin exosmoza electroliților*, St. cerc. biochim., **8**, 221 (1965).
7. E. E. Daniel, D. A. Boyes, J. Mc. Cartney, D. Dalgleish, *The electrolytes of the human uterus and their possible relation to functional activity*, Amer. J. Obstet. a. Gynec., **73**, 395 (1957).
8. E. Odeblad, B. Westin, K. G. Malmfors, *Determination of sodium and phosphorus in human cervical mucus with activation analysis*, Acta radiol., Stockh., **49**, 137 (1958).
9. J. C. Stoclet, *Comparison of the distribution of calcium-45 and sodium-24 between blood plasma and different organs of the rat*, Compt. Rend., **248**, 3 229 (1959).
10. C. Herovici, V. Acosta, *Intracellular potassium. Correlation between potassium and neoplastic proliferation*, Bull. Ass. franç. Cancer, **45**, 38 (1958).
11. Mioara Cârsteanu, *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din pielea umană în diferite stări patologice*, St. cerc. biochim., **9**, 263 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 205–209 (1967)

ABSORBȚIE INTESTINALĂ DE COMPONENTE ANTIGENICE ÎN TULBURĂRI DIGESTIVE CONSECUTIVE DENUTRIȚIEI

N. ȘT. CHIȘIU

Rezumat. — Se considera în general că, cu excepția perioadei imediat postnatale, proteinele sînt absorbite din intestin după o prealabilă scindare moleculară pînă la aminoacizii de constituție. În cercetări anterioare, autorul a demonstrat însă că tractul digestiv absoarbe și transferă în circulația generală molecule proteice întregi (cu caracterele antigenice și funcționale nemodificate), indiferent de vîrstă, dacă activitatea enzimelor proteolitice digestive este inhibată corespunzător.

Ineficiența sau insuficiența enzimelor proteolitice digestive poate surveni însă în diverse stări clinice, cu deosebire în carențe nutritive, situații în care ar trebui să existe și absorbții de macromolecule antigenice din intestin — un adevărat fenomen de malabsorbție. Ipoteza este verificată în scorbutul experimental la cobai și în aniacinoza umană. În ambele stări clinice se evidențiază absorbția din tractul digestiv a unor componente din laptele de vacă sau din albușul de ou crud nemodificate antigenic.

În raport cu aceste date, se discută relații patogenetice posibile între maldigestie și malabsorbție și complicații imunoalergice, inclusiv procese de tip autoimun cu adresă hepatică.

Este stabilit că, după administrarea intravenoasă de proteine eterologe, parte din acestea se elimină prin urină, parte prin bilă [4] iar unele, traversînd mucoasa în sens contrar absorbției, ajung în lumenul intestinal, cu sau fără modificarea antigenicității [10], [11]. De altă parte, același fenomen se reproduce atunci cînd proteine eterologe sînt introduse cu sonda în stomac împreună cu inhibitori enzimatici de tip antitripsină [4], [9], [16]. Ar trebui deci ca o astfel de absorbție intestinală — inclusiv eliminarea urinară — să survină ori de cîte ori stări de denutriție diverse afectează tractul digestiv și activitatea sa proteolitică. Avitaminoza C, indusă experimental la cobai, este însoțită — spre faza finală — de o mare cădere a curbei ponderale și de diaree, oferind deci cadrul unei denutriții cu tulburări digestive. În clinică, o situație asemănătoare se întîlnește în aniacinoză. Tulburările digestive, inclusiv scăderea ponderală din aceste avitaminoze, n-ar fi specifice, ci ar ține de o carență proteică concomitentă sau secundară, la care tubul digestiv, în general, și pancreasul, în special, sînt foarte sensibili [21], [22].

În astfel de situații am cercetat, la cobai și la om, absorbția din intestin a unor proteine alimentare nemodificate antigenic.

MATERIAL ȘI METODĂ

Un număr de 46 de cobai, cu un regim alimentar carențat în vitamină C, și 4 cazuri cu aniacinoză clinică umană s-au supus următoarei probe de digestie-absorbție cu lapte pasteurizat și albuș de ou crud (acesta din urmă numai la cobai):

a) La cobai normali (lot martor) sau după 12—16 zile de regim alimentar lipsit de vitamină C (nutreturi autoclavate) se administrează intragastric, cu sonda, 10 ml lapte de vacă pasteurizat sau 5 ml albuș de ou crud diluat 1/1 cu ser fiziologic. După 4—6 ore, animalele sînt sacrificate prin decapitare și concomitent se recoltează sînge, urină și bilă veziculară.

b) Bolnavilor cu aniacinoză li s-a dat să bea liber 750—1 000 ml lapte de vacă pasteurizat în interval de circa 30 min, după care au fost recoltate separat probe de urină din toate micțiunile survenite în următoarele 24 de ore.

Cu ajutorul a două seruri imune, unul antilapte de vacă și altul antialbuș de ou de găină, am căutat apoi prezența antigenelor specifice în probele recoltate atît de la cobai, cît și de la oameni, prin metoda dublei difuzii în agar (Ouchterlony).

REZULTATE

A. La 4 ore după administrarea intragastrică de albuș de ou de găină crud la 6 cobai normali, se găsește în urină un antigen de albuș la 2 cobai. Aceeași probă, făcută la 6 cobai în stare de denutriție, indică absorbția din intestin, respectiv prezența unui antigen din albușul de ou în urină la 4 cazuri, dintre care la 3 și în bila veziculară. Probele de mai sus sînt negative în urina, serul și bila recoltate de la cobai normali sau scorbutici, dar neintubați cu albuș de ou crud.

Cînd în loc de albuș de ou crud s-a administrat la cobai lapte de vacă (pasteurizat), s-a realizat o absorbție de componente antigenice din lapte numai la animalele scorbutice, respectiv în stare de denutriție consecutivă carenței de vitamină C. Diagramele de imunoprecipitare cu aceste rezultate sînt reproduse în figurile 1 și 2 (*a* și *b*).

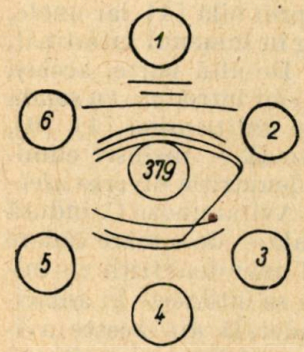


Fig. 3. — Absorbția din tractul digestiv a unor componente antigenice din laptele de vacă (*1*) și eliminarea lor urinară (*2—6*) la om cu aniacinoză clinică (cazul Z.). În centru (*379*), ser de iepure imun antilapte de vacă. Lapte de vacă din cel folosit în proba de digestie-absorbție (*1*). Administrarea laptelui la orele 9 și 30 min. Probe din emisiuni de urină consecutive la orele 10 și 30 min (*2*), 14 și 30 min. (*3*), 17 (*4*), 21 (*5*) și a doua zi dimineața (*6*). Reacția pozitivă în *3* și *4*.

B. După administrare de lapte la om cu aniacinoză floridă (cazul Z.), se detectează imunologic în urina acestuia un antigen specific (din lapte) la 4—5 ore și încă alte două antigene la 7—8 ore. În următoarele probe de urină, reacția este negativă (fig. 3).

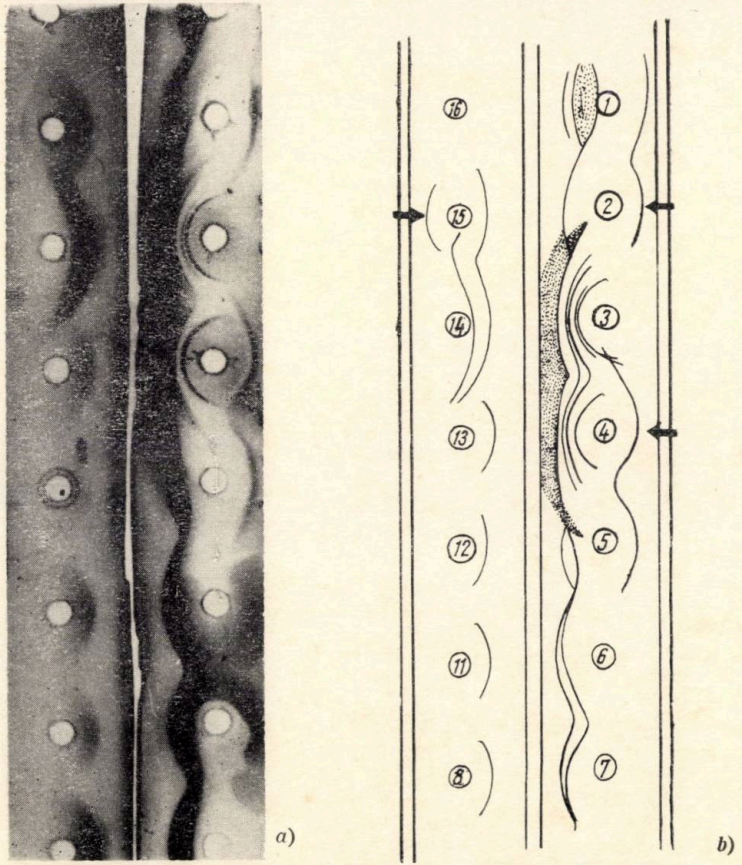


Fig. 1 (*a* şi *b*). — Dublă difuzie în gel de agar. Urină (*1, 2, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14*), ser sanguin (*3, 4*) şi bilă veziculară (*6, 9, 10, 15, 16*) de la cobai normali (*1, 10*) şi scorbutici după intubarea intragastrică cu lapte de vacă sau cu albuş de ou de găină crud. Săgeţile negre indică antigenul absorbit la nivelul tractului digestiv şi, respectiv, eliminat nemodificat în urină sau în bilă.

În şanţul central : ser imun de iepure antiser sanguin de cobai ; în şanţul din stînga : ser imun de iepure antilapte de vacă ; în şanţul din dreapta : ser imun de iepure antialbuş de ou de găină.

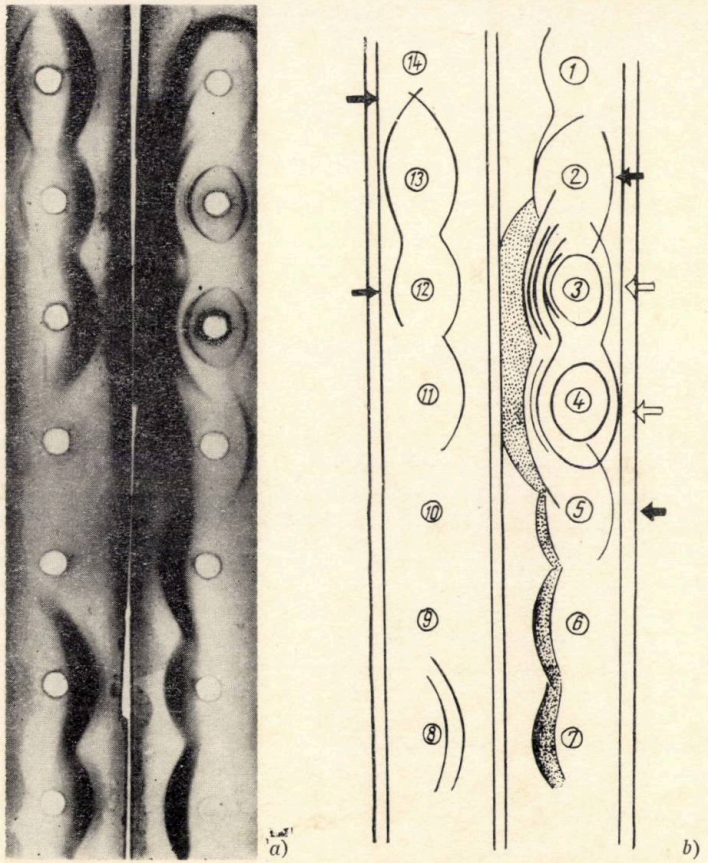


Fig. 2 (*a* şi *b*). — Proba imunoprecipitării prin dublă difuzie în gel de agar (ca în figura 1) la alte cazuri. Urină de cobai în *1, 4, 7* (neintubat), *8, 9, 10, 11, 13*, bilă veziculară (*5, 6, 14*) şi ser sanguin (*2, 3*). Săgeţile albe indică reacţii nespecifice (a se compara cu probele *3* şi *4* din fotografia 1 *a*), iar cele negre arată antigenele specifice absorbite şi, respectiv, eliminate din organism.

Se interpretează acest rezultat în sensul că unele proteine din laptele ingerat, nesupuse unei acțiuni proteolitice eficiente, au fost absorbite ca atare la nivelul tubului digestiv și eliminate apoi prin urină.

Proba atestă de fapt ineficiența enzimelor proteolitice digestive și, consecutiv, un fenomen de malabsorbție.

DISCUȚII

Starea de denutriție constatată clinic atît în scorbutul experimental, cît și în aniacinoza umană ar putea justifica insuficiențe ale pancreasului exocrin, dacă ne referim la o serie de observații, consemnate în literatură, privind în special carența proteică [21], [22], [25], ori chiar pelagra clinică sau experimentală [12]. În astfel de situații au fost puse în evidență insuficiențe pancreatice de diverse grade, mergînd pînă la absența enzimelor digestive [6], [19], [20]. Coroborînd aceste date cu experiențe anterioare în care s-a arătat că în perioada neonatală [4], [7], [8] sau, mai tîrziu, sub acțiunea unui factor antitriptic [4] intestinul absoarbe molecule proteice întregi, putem interpreta că atît în scorbutul experimental, cît și în aniacinoza umană ar exista o suferință a pancreasului exocrin, în general a enzimelor proteolitice. În aceste condiții, tractul digestiv nu va mai fi o barieră eficientă în calea pătrunderii unor substanțe antigenice în circulația generală, dintre care cele citate aici sînt doar cîteva exemple.

Ținînd seama că în literatura de specialitate se face frecvent o asociație între maladia fibro-chistică a pancreasului și unele afecțiuni hepatice, inclusiv ciroze [1], [2], [17], credem că în condițiile insuficienței enzimelor proteolitice pot fi absorbite din intestin și antigenele specifice biliare [3] care, la rîndul lor, ar putea fi incriminate în declanșarea unor procese de autoagresiune, justificînd astfel relația dintre pancreatite și ciroze, respectiv denutriții : pancreatite și ciroze de tip biliar. De altfel, unii autori notează că atingerea pancreatică este anterioară suferinței hepatice [23], [34], iar pe de altă parte o relație între denutriție și ciroză a fost făcută de diverși autori [13—15], [18], [26]. Am susține în plus această interpretare cu unele date obținute de noi la copilul nou-născut, la care se știe că tubul digestiv absoarbe proteine colostrale întregi [4]. Pe lîngă aceste proteine, recent am putut pune în evidență și absorbția unor antigene biliare [5], prezente în meconiu încă în perioada de viață intrauterină a fătului. Absorbția antigenelor biliare în această perioadă de viață poate induce o toleranță imunitară [7], dar, mai tîrziu, în funcție de evoluția reactivității organismului, deci de la caz la caz, va putea declanșa un proces autoimun.

Evident că absorbția unor substanțe antigenice din intestin poate crea și alte neajunsuri, printre care am nota alergiile alimentare, diverse șocuri proteice ș. a., toate venind să complice tabloul clinic al suferinței inițiale. Pentru o astfel de înlănțuire faptică, în aniacinoza umană, de exemplu, hiper-gamma-globulinemia semnalată anterior ar fi un indiciu important.

CONCLUZII

1. În denutriţia experimentală din scorbut şi în cea clinică din aniacinoza umană, intestinul absoarbe molecule proteice de origine alimentară, enzimelor fără a altera antigenicitatea lor.

2. Se interpretează aceasta ca indicînd existenţa unor deficienţe ale enzimelor proteolitice digestive şi, consecutiv, o malabsorbţie.

3. Se comentează complicaţia posibilă a suferinţelor primare, respectiv a denutriţiei, prin procese imunologice supraadăugate, inclusiv procese de autoagresiune. Dintre acestea din urmă se reţin unele cu adresă hepatică.

Prezentată la redacţie
la 17 septembrie 1966

Spitalul „Dr. I. Cantacuzino”,
Laboratorul experimental
Bucureşti, str. I. Movilă 5—7

BIBLIOGRAFIE

1. Bergamini A., F. Cavazzuti, E. Ventura, M. Coppo, *Malattie epatiche e pancreatiche da nutrizione inadequata*, Edit. D. L. Pozzi, Roma, 1958, p. 233.
2. Bodian M., *Fibrocystic disease of the pancreas*, Heinemann, Londra, 1952.
3. Chişiu Şt. N., *Constituenţi antigenici proprii şi de origine sanguină în bila hepatică şi veziculară umană*, Şt. cerc. biochim., **8**, 427 (1965).
4. Chişiu Şt. N., *Cenzura proteinoclazică în absorbţia de proteine şi polipeptide din intestin*, St. cerc. biochim., **9**, 269 (1966).
5. Chişiu Şt. N., *Eliminarea urinară de antigeni proprii biliari la copil în primele zile după naştere*, St. cerc. biochim., 1967 (sub tipar).
6. Fanconi G., E. Rossi, A. Prader. *La fibrose pancréatique avec bronchectasies. Dysporia enterobronchopancreatica mucoviscidosis*, Rev. int. Hépat., **6**, 359 (1956).
7. Fillipp G., *Further studies on the question of the induction of immune tolerance using an orally administered antigen solution in the neonatal period*, Acta allerg., **20**, 47 (1956).
8. Freda V. J., *Placentar transfer of antibiodies in man*, Amer. J. Obstet. Gynec., **84**, 1 756 (1962).
9. Fredericq E., H. F. Deutsch, *Studies on ovomucoid*, J. biol. Chem., **181**, 499 (1949).
10. Gheţie V., C. Medeşan, N. Şt. Chişiu, *Distribuţia şi modificarea antigenităţii albuminei umane fluorescente, reţinută în organele, celulele şi umorile unor animale de experienţă*, St. cerc. biochim,. **10**, 19 (1967).
11. Gheţie V., Medeşan, N. Şt. Chişiu, *Retention and breakdown of fluorescent human albumin by the rat small intestine perfused „in situ”*, Rev. roum. Biochim., **4**, 137 (1967).
12. Gillman J., T. Gillman, *Perspectives in human malnutrition*, Grune and Stratton, New York, 1951.
13. Kalk H., *Liver insufficiency*, Dtsch. med. Wschr., **225** (1950).
14. Kalk H., *Cirrhose und Narbenleber*, F. Enke, Stuttgart, 1954.
15. Kaplan M. H., A. M. Cotlar, S. J. Stagg, *Pancréatite aiguë*. Amer J. Surg., **108**, 24 (1964).
16. Lineaweaver A. C., C. W. Muray, *Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid*, J. biol. Chem., **171**, 565 (1947).
17. Necheles H., *Relationship between hepatic and pancreatic function*, Amer. J. Gastroent. **40**, 148 (1963).
18. Pathwardhan V. N., *Nutrition in India*, 3e Congr. Internat. Nutrition, Amsterdam, Sept. 1954.
19. Richmond R. C., H. Schwachmann, *Fibrocystic disease of the pancreas-chymotripsin activity of duodenal fluid*, Pediatrics, **16**, 207 (1955).

20. Sammons A. G., C. A. Ross, W. A. Wood, *Proteolytic activity in the faces of children and adults, and its relation to pancreatic fibrosis, celiac disease and ulcerative colitis*, Clin. Sci., **14**, 157 (1955).
21. Seifert G., *Die Pathologie des kindlichen Pankreas*, Thieme Verlag, Leipzig, 1956.
22. Sénécal J., H. Dupin., *Le foie et le pancréas dans le Kwashiorkor*, Rev. int. Hépat., **6**, 189 (1956).
23. Véghelyi P. V., *Pancreatic function and protein deficiency*, Acta paediat., **36**, 128 (1948).
24. Véghelyi P. V., T. T. Kemenyi, J. Poszonyi, J. Sós, *Dietary lesions of the pancreas*, Amer. J. Dis. Child., **79**, 658 (1950).
25. Véghelyi P. V., J. Sós, T. T. Kemenyi, *Alimentary visceral injury*, Amer. J. Dis. Child., **90**, 28 (1955).
26. Walters J. H., J. C.Waterlow, *Fibrosis of the liver in the West African children*, Med., res. council reports nr. 285, H. Maj. Stat. Off., Londra, 1954.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 211–215 (1967)

INFLUENŢA DIFERITELOR SISTEME TAMPON ASUPRA ACTIVITĂŢII LIPAZEI DIN FLOAREA-SOARELUI

VASILE DANKANITS şi TIBERIU LÁSZLÓ

577.12

Rezumat. — S-a determinat activitatea lipazei din semințele de floarea-soarelui, folosindu-se miezuri de semințe nedegresate și degresate. Determinările s-au făcut comparativ cu trei sisteme tampon, folosindu-se pentru determinări o metodă titrimetrică.

S-a constatat că atît valorile absolute ale activității lipazice, cît și aspectul curbelor de variație a acesteia, în funcție de pH, depind de tipul soluției tampon folosite. De aceea, la studiul activității lipazei, folosirea mai multor sisteme tampon de tip diferit de-a lungul intervalului pe pH luat în cercetare este discutabilă din punct de vedere metodologic și interpretarea datelor astfel obținute este problematică. Este indicată folosirea aceluiași sistem tampon pentru îmbrățișarea unui domeniu de pH cît mai larg.

În condițiile experimentale descrise, rezultatele cele mai concludente s-au obținut în cazul folosirii miezurilor de semințe de floarea-soarelui degresate și a sistemului tampon acid citric — fosfat disodic.

Dintre lipazele din semințele plantelor de cultură, pînă în prezent au fost studiate mai amănunțit acelea din ricin [1], [2], rapiță [3], [5], mac, in, floarea-soarelui [4], [5], secară, orz, ovăz, grîu [5], [6] și soia [7].

La cercetarea activității enzimelor, rezultatele pot fi influențate în măsură însemnată de tipul soluțiilor tampon utilizate la determinări.

Astfel de investigații au fost deja făcute în legătură cu ureaza [8], [9] și catalaza [9], însă în ce privește lipazele vegetale nu dispunem de date similare. În literatură sînt cunoscute lucrări în care pentru studiul corelației dintre pH și activitatea lipazei de-a lungul unui domeniu de pH mai larg, au fost folosite mai multe soluții tampon de tipuri diferite [4].

Scopul prezentei lucrări este stabilirea măsurii în care diferitele sisteme tampon influențează activitatea lipazei în același interval de pH și clarificarea problemelor de metodică ivite în legătură cu aceasta.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a determinat comparativ activitatea lipazei din miezuri de semințe degresate și nedegresate.

Pentru determinare se iau 2 g miezuri de semințe nedegresate sau 1 g miezuri degresate, 1 ml ulei de floarea-soarelui purificat și 5 ml soluție tampon; se pun într-un mojar de porțelan și se triturează pînă la obținerea unui terci uniform.

Terciul obţinut se trece, cu 5 ml apă distilată, într-un flacon Erlenmeyer, unde se mai introduce 1 ml toluen, se închide cu dop de cauciuc şi se pune în termostat la 30°C, timp de 24 de ore. După aceasta se introduc 50 ml amestec 4 : 1 de alcool-eter şi 0,5 ml fenolftaleină, soluţie alcoolică 1%. Acizii graşi puşi în libertate se titrează cu KOH alcoolic 0,1 N.

Paralel se pregătesc şi probe martor, care înainte de introducerea toluenului se inactivează timp de 5 min într-o baie de apă fierbinte.

Activitatea enzimei este dată de diferenţa dintre numărul de ml de KOH consumaţi pentru titrarea probei de cercetat şi probei martor şi se raportează la 1 g substanţă uscată.

Miezurile de seminţe de floarea-soarelui se degresează în felul următor : 200 g miezuri de seminţe de floarea-soarelui, mărunţite, se introduc într-o pîlnie de separare, în care se tratează cu 1 000 ml eter de petrol timp de 45 min. Extragerea se repetă de încă cinci ori cu solvent proaspăt [4].

Miezurile de seminţe degresate se usucă, se triturează şi se ţin la loc rece, într-un borcan bine închis.

Uleiul folosit pentru experienţe a fost purificat cu NaOH 2%, după o metodă cunoscută [10].

Activitatea lipazei a fost studiată în trei serii de experienţe, în care s-au folosit următoarele sisteme tampon : acid acetic-acetat de sodiu (Walpole), acid citric-fosfat disodic (Mc Ilvaine) şi fosfat monopotasic-fosfat disodic (Sörensen).

Valorile pH-ului în cele trei serii au fost :

acid acetic-acetat de sodiu :	3,19 ; 3,80 ; 4,10 ; 4,40 ; 4,70 ; 5,00 ; 6,22 ;
acid citric-fosfat disodic :	2,20 ; 3,00 ; 3,80 ; 4,20 ; 4,40 ; 4,80 ; 5,00 ; 6,00 ; 7,00 ; 7,60 ; 8,00 ;
fosfat monopotasic-fosfat disodic :	4,49 ; 4,94 ; 5,29 ; 5,91 ; 6,98 ; 8,04 ; 8,68 ; 9,18.

S-a lucrat cu seminţe de floarea-soarelui din soiul VNIIMK, după o perioadă de repaus de opt luni de la recoltare.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele experienţelor sînt reprezentate grafic în figurile 1 şi 2, activitatea lipazei fiind exprimată în ml KOH 0,1 N şi raportată la 1 g substanţă uscată.

Din grafice reiese că aspectul curbelor variază în măsură destul de mare în funcţie de sistemul tampon folosit şi, în consecinţă, apar diferenţe relativ mari între valorile absolute ale activităţii determinate. De asemenea, există diferenţe şi între poziţia relativă a maximelor şi minimelor de activitate.

Valorile de activitate găsite în cazul miezurilor de seminţe nedegresate sînt relativ mici şi oscilează între limitele 1,3 şi 4,3 ml KOH 0,1 N. Curbele de activitate au în acest caz o formă alungită, cu maxime şi minime mai puţin pregnante. Aceasta se datoreşte probabil şi erorii de experienţă relativ mai mari.

Activitatea enzimatică este mai mare în cazul miezurilor de seminţe degresate şi variază între limitele de 3,35 şi 12,40 ml KOH 0,1 N. În acest caz, maximele şi minimele sînt mai pronunţate şi, pe lîngă aceasta, aspectul curbelor este mai asemănător.

De asemenea se poate constata apariţia a două maxime de activitate, fapt semnalat şi de Prokofiev şi Noviţkaia [4], însă în condiţiile

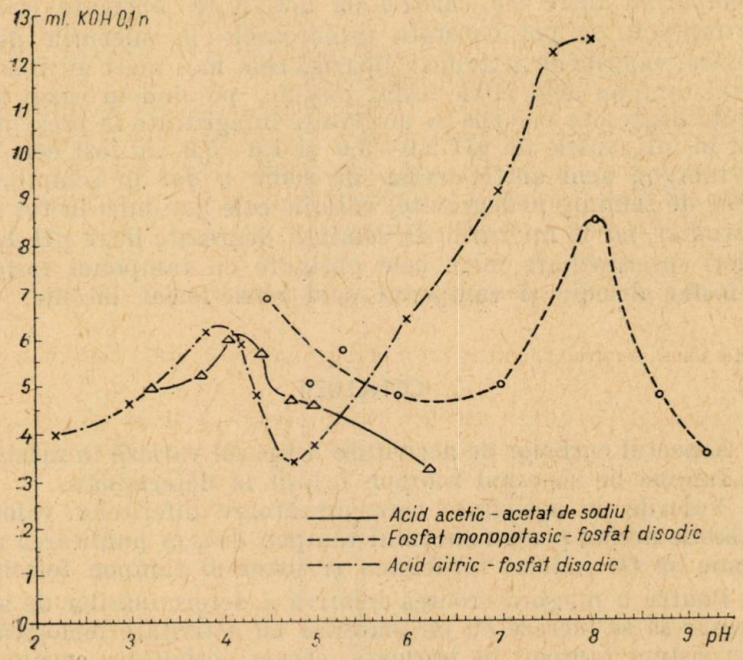


Fig. 1. — Variaţia activităţii lipazei la miezurile de seminţe de floarea-soarelui degresate, în funcţie de soluţia tampon şi de pH.

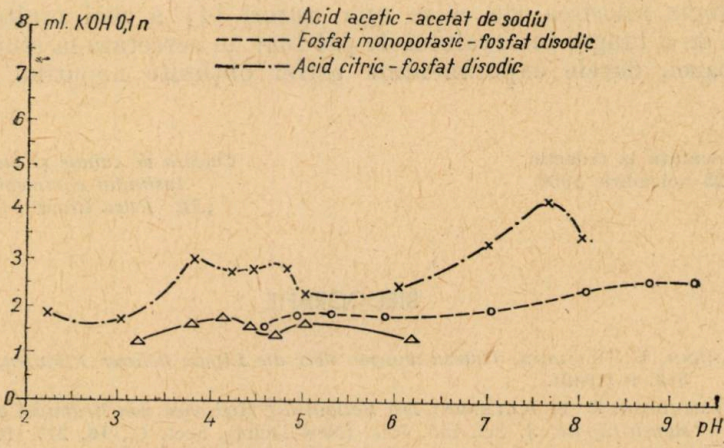


Fig. 2. — Variaţia activităţii lipazei la miezurile de seminţe de floarea-soarelui nedegresate, în funcţie de soluţia tampon şi de pH.

utilizării mai multor tipuri de amestecuri tampon de-a lungul domeniului de pH cercetat.

Comparînd între ele curbele de activitate obţinute cu diferitele sisteme tampon, se pot constata următoarele : la miezurile de seminţe nedegresate, valorile de activitate lipazică cele mai mari au fost obţinute cu soluţia tampon acid citric-fosfat disodic, pe cînd în cazul miezurilor de seminţe degresate valorile de activitate înregistrate în prezenţa acestui tampon, în intervalele de pH 2,0—3,0 şi 4,0—5,0, au fost cele mai mici. Soluţia tampon acid acetic-acetat de sodiu a dat în schimb, în cazul miezurilor de seminţe nedegresate, valorile cele mai mici în tot intervalul de pH studiat, iar la miezurile de seminţe degresate între pH 4,0 şi 5,3 a dat valori intermediare între cele obţinute cu tamponul fosfat monopotasic-fosfat disodic şi tamponul acid citric-fosfat disodic.

CONCLUZII

1. Aspectul curbelor de activitate a lipazei variază în măsură însemnată în funcţie de sistemul tampon folosit la determinări.

2. Valorile de activitate corespunzătoare diferitelor valori de pH fiind valabile numai pentru sistemul tampon dat, la publicarea rezultatelor trebuie să fie indicat totdeauna şi sistemul tampon folosit.

3. Pentru a micşora eroarea relativă a determinărilor de activitate, este necesar să se lucreze cu un material cu activitate biologică maximă şi cu un sistem tampon în prezenţa căruia activitatea enzimatică este cea mai mare şi cu ajutorul căruia se poate cuprinde un domeniu cît mai larg de pH, valorile de activitate înregistrate fiind totodată semnificativ diferenţiate între ele.

4. Cercetările descrise au arătat că această cerinţă a fost satisfăcută în măsura cea mai mare în cazul folosirii miezurilor de seminţe degresate şi a sistemului tampon acid citric-fofat disodic.

5. În lumina celor de mai sus, este discutabilă din punct de vedere metodologic folosirea de către unii autori [4] a mai multor sisteme tampon de-a lungul intervalului de pH luat în cercetare la studiul activităţii lipazei, datele experimentale astfel obţinute neputînd fi corelate corect.

Prezentată la redacţie
la 23 noiembrie 1966

Catedra de chimie şi biochimie
Institutul agronomic
„Dr. Petru Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. E. Bamann, E. Ullmann, *Untersuchungen über die Lipase höherer Pflanzen*, Biochem. Z. **312**, 9 (1942).
2. H. Nizamuddin, B. S. Kulkarni, *Der Verlauf der Hydrolyse von Erdnußöl durch Ricinussamen-Lipase*, J. Sci. ind. Res. (New Delhi), Sect. C., **16**, 217 (1957).
3. L. R. Wetter, *Some properties of the lipase present in germinating rapeseed*, J. Amer. Oil Chemist's Soc., **34**, 66 (1957).

4. A. A. Prokofiev, G. V. Novițkaia, *O svoistvah lipazi semian maslicinih rastenii*, Biohimiia, **23**, 612 (1958).
5. M. Rothe, *Enzymatische Fetthydrolyse im Verlauf der Keimung des Getreides*, Getreides u. Mehl., **7**, 113 (1959).
6. R. Olered, *Enzyme studies in wheat and rye*, Ber. Getreidetagung, Detmold, **40**, 8 (1963).
7. H. Kunert, *Zur Aktivierung der Soja-Lipase*, Flora (Jena), **152**, 168 (1962).
8. S. F. Howel, I. B. Sumner, *The specific effects of buffers upon urease activity*, J. biol. Chem., **104**, 619 (1934).
9. Z. S. Kagan, *Vliianie sostava bufernogo rastvora na ureaznuiu aktivnost bakterialnih kletok i ekstraktov*, Dokladî Akad. Nauk SSSR, **110**, 607 (1956).
10. A. I. Ermakov, V. V. Arasimovici, M. I. Smirnova-Ikonnikova, I. K. Murri, *Metodî biohimiceskogo issledovania rastenii*, Gos. izd. selskohoz. lit., Moscova, 1952, p. 680–690.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 217–226 (1967)

STUDIUL DINAMIC AL CAPACITĂŢII DE RESTABILIRE A ŞOBOLANULUI ALB DUPĂ DISTROFIA MAIDICĂ EXPERIMENTALĂ

ILEANA DINU

622.14

Rezumat. — S-a cercetat pe 120 de şobolani albi capacitatea de restabilire şi modul în care se modifică concentraţia proteinelor hepatice a ADN, activitatea succin-dehidrogenazei (SD), transaminazei glutamic-aspartice, (GOT), fosfatazei acide şi alcaline, după trecerea animalelor de la un regim maidic la un regim normoproteic cu bază de cazeină.

După 4 săptămîni de restabilire, greutatea animalelor a rămas cu 37% mai mică decît a lotului cu 18% cazeină şi cu 30% faţă de lotul cu 8% cazeină. Eficienţa proteică, deşi a crescut în toată perioada de restaurare, s-a menţinut sub nivelul loturilor cu cazeină, ca şi ingesta. Greutatea ficatului s-a mărit prin creşterea conţinutului de proteine şi a altor componenţi celulari, fără a avea loc o înmulţire a numărului de celule, fapt care reiese din scăderea concentraţiei ADN în primele 3 săptămîni. Biosinteza de proteine s-a accentuat în perioada de restabilire, însă nu a atins nivelul lotului normoproteic. Activitatea SD a crescut din prima săptămînă cu 20%, depăşind valorile lotului cu 18% cazeină, iar activitatea GOT (cu 19%) a fost superioară valorilor lotului cu 8% cazeină, însă a rămas sub valorile lotului normoproteic. Activitatea fosfatazei acide în perioada de restaurare a evoluat similar cu aceea a lotului normoproteic, iar a fosfatazei alcaline a scăzut în perioada de refacere cu 33%, ceea ce a dus la normalizarea activităţii enzimei.

În cercetări anterioare [6], [7] s-a stabilit că hrănirea cu uruială de porumb a şobolanilor albi, tineri, a determinat, pe lîngă modificările caracteristice distrofiei maidice experimentale [9—11] o creştere a activităţii succin-dehidrogenazei (SD), a fosfatazei acide şi alcaline şi a conţinutului în acid dezoxiribonucleic (ADN) pe unitatea de ficat, precum şi o scădere a activităţii transaminazei glutamic oxal-acetice (GOT). S-a stabilit de asemenea că modificările enzimatice înregistrate diferă de cele produse de o raţie pe bază de cazeină şi avînd acelaşi conţinut de azot total, ceea ce reflectă reacţia metabolică la calitatea proteinelor din dieta maidică.

Numeroase cercetări efectuate în ultimii ani [4], [5], [16] au arătat că, pentru a putea aprecia amploarea, gravitatea şi semnificaţia reacţiei metabolice la o alimentaţie neadecvată (foame, carenţă proteică, regimuri dezechilibrate), este necesar să se cerceteze nu numai modificările care apar în condiţia dată, dar şi capacitatea de revenire după normalizarea dietei. Cercetarea activităţii enzimatice în perioada de restaurare permite să se aprecieze reversibilitatea modificărilor înregistrate, să se precizeze

relaţiile cauzale dintre regimul alimentar şi tulburarea metabolică şi aduce contribuţii teoretice la cunoaşterea unei anumite verigi metabolice. Astfel, urmărind modificările activităţilor enzimatice determinate de regimurile aproteice şi modul în care tulburările înregistrate dispar, s-a putut preciza în ce fel are loc încorporarea aminoacizilor în proteinele hepatice în condiţiile unei carenţe proteice [2], [8], s-au putut pune în evidenţă modificările care survin în condiţii similare în lanţul transportorilor de electroni legat de succinatul hepatic [1], [3], rolul aminoacizilor sulfuraţi în revenirea la normal a acestei funcţii alterate [3] etc.

Ţinînd seama de aceste date, precum şi de faptul că unii autori [18] au găsit că la cîini cu distrofie maidică experimentală vindecarea metabolică survine mult mai tîrziu şi mai dificil decît vindecarea clinică, în această lucrare ne-am propus să urmărim capacitatea de restabilire şi modul în care se normalizează activitatea unor enzime hepatice la şobolani albi după trecerea lor de la un regim maidic la un regim normoproteic pe bază de cazeină.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe 120 de şobolani albi, în vîrstă de 3—4 săptămîni, proveniţi din aceeaşi generaţie, cu o greutate în jur de 40 g, împărţiţi în 15 loturi de cîte 8 animale pe lot. Animalele au fost menţinute în cuşti individuale şi hrănite *ad libitum* cu unul din următoarele trei regimuri:

În prima serie de 5 loturi s-a folosit un *regim normoproteic* care conţine cazeină 18 g%, amestec de săruri (după Osborne-Mendel) 4 g%, ulei de floarea-soarelui (*oleum helianthi*) 8 g%, agar-agar 2 g%, drojdie de bere uscată 4 g% şi amidon pînă la 100g. Fiecărui animal i se administrează săptămînal cîte 270 u. i. de vitamina A, 100 u. i. vitamina D_2 şi 1 mg vitamina E. Conţinutul în azot al mixturii era de 2,488 g%, ceea ce reprezintă 15,55 g% proteine brute. Regimul a fost administrat timp de 5 săptămîni, după care s-a sacrificat săptămînal cîte un lot timp de

Tabela

Capacitatea de restabilire a creşterii şobolanului alb

Săptămîna de experienţă	Săptămîna de restabilire	Greutatea finală (g)			Ingesta (g/zi)		
		cazeină 18%	cazeină 8%	porumb refăcut	18%	8%	P
		M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES
V		128,6± 8,96	112,1± 6,16	57,6± 2,38	12± 0,50	12,2± 0,52	8,1± 0,53
VI	I	142,8± 9,25	123,6± 6,48	85,8± 3,47	12,7± 0,67	13 ± 0,67	8,7± 0,53
VII	II	134,5± 6,39	139,7± 6,91	105,3± 6,31	11,9± 0,22	13± 0,69	8,4± 0,34
VIII	III	169,6± 13,7	155,9± 9,5	124,4± 5,4	13,2± 0,53	13,3± 0,78	10,2± 0,40
IX	IV	178,5± 16,1	170 ± 11,2	129,8± 2,6	12,0± 0,55	13,7± 0,66	9,4± 0,18

încă 5 săptămîni. În acest fel s-au obținut loturi menținute la regimul normoproteic între 5 și 9 săptămîni.

În a doua serie de 5 loturi s-a întrebuințat un *regim hipoproteic* cu aceeași compoziție ca și primul, numai că proporția de cazeină a fost redusă la 8 g%, diferența completîndu-se cu amidon. Conținutul regimului în azot era de 1,552 g%, ceea ce reprezintă 9,7 g% proteină brută. S-a folosit aceeași dinamică de sacrificare a loturilor ca și la regimul normoproteic.

În a treia serie de 5 loturi, animalele au primit un regim a cărui unică sursă de proteine era mălaiul, la care s-au adăugat 2 g% ulei de floarea-soarelui și vitaminele A, D și E, conținutul în azot al amestecului fiind de 1,462 g%, respectiv 9,14 g% proteine.

După 5 săptămîni de administrare a regimului maidic s-a sacrificat un lot de animale, celelalte 4 loturi fiind trecute la regimul normoproteic pe bază de cazeină, indicat mai sus. Ulterior s-a sacrificat săptămînal cîte un lot pe intervalul celor 4 săptămîni de restabilire.

La animalele de experiență s-a urmărit ingesta de alimente, prin cîntărirea mîncării o dată la 2 zile, precum și cîștigul săptămînal în greutate. Cunoscîndu-se atît spor ul ponderal, cît și consumul și compoziția regimului, s-a calculat eficiența proteică (cîștigul în greutate pe g de proteină ingerată). Animalele au fost sacrificate prin decapitare, recoltîndu-se ficatul. Într-un omogenat hepatic 10% în manitol (0,25 M) s-a determinat conținutul în proteine totale, acid dezoxiribonucleic (ADN), precum și activitatea succin-dehidrogenazei (SD), transaminazei glutamic-aspartice (GOT), fosfatazei acide și alcaline. Metodele folosite au fost expuse în cercetări anterioare [6]. Valorile obținute s-au raportat atît la unitatea de ficat umed, cît și la ficatul total și au fost prelucrate statistic.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

I. Creșterea șobolanului alb, conținutul în ADN și proteine totale al ficatului

Trecerea animalelor de la regimul maidic la rația cu cazeină 18% a determinat din prima săptămînă o ameliorare evidentă a creșterii. Astfel, în timp ce ritmul mediu de creștere la regimul maidic a fost de

1

după distrofia maidică experimentală (date medii pe lot)

Eficiența proteică			Greutate ficat (g)			Greutate ficat (g/100 g corp)		
18%	8%	P	18%	8%	P	18%	8%	P
M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES	M ± ES
1,66± 0,09	2,09± 0,15	0,77± 0,07	4,7± 0,37	4,3± 0,29	2,6± 0,16	3,7± 0,28	3,9± 0,16	4,5± 0,21
1,51± 0,10	1,91± 0,07	0,94± 0,04	4,9± 0,32	4,4± 0,21	3,6± 0,32	3,6± 0,45	3,5± 0,09	4,2± 0,32
1,44± 0,10	1,93± 0,07	1,20± 0,11	5,1± 0,18	4,2± 0,28	4,2± 0,28	3,8± 0,22	3,4± 0,11	4,0± 0,16
1,36± 0,10	1,89± 0,08	1,10± 0,04	5,6± 0,17	5,0± 0,9	5,1± 0,28	3,4± 0,50	2,8± 0,19	4,1± 0,14
1,40± 0,09	1,82± 0,08	1,13± 0,03	6,1± 0,72	5,5± 0,47	4,8± 0,22	3,2± 0,25	3,2± 0,11	3,6± 0,11

10% [7], după trecerea animalelor la regimul normoproteic cîştigul mediu în greutate a fost în prima săptămînă de 48% ($p < 0,001$). Ulterior, ritmul creşterii s-a încetinit, sporul ponderal în a doua săptămînă fiind de 22% ($p < 0,003$), în a treia de 19% ($p < 0,002$), iar în a patra de 4% ($p < 0,005$). Pe toată perioada refacerii, cîştigul în greutate a fost în medie de 125% ($p < 0,001$). Dacă după 5 săptămîni de administrare a regimului maidic greutatea corporală a fost în medie cu 123% mai crescută la lotul cu 18% cazeină, respectiv cu 94% mai mare la lotul cu 8% cazeină, după 4 săptămîni de refacere diferenţele s-au redus la 37%, respectiv la 30%, rămînînd totuşi semnificative statistic ($p < 0,001$). Creşterea animalelor cu 48% în prima săptămînă de restaurare s-a datorat nu atît creşterii valorii calorice a regimului sau ameliorării eficienţei proteice, ci a fost determinată mai ales de majorarea proporţiei de proteine din hrană. Astfel, în timp ce ingesta a crescut doar de la 8,1 la 8,7 g/zi (7%), iar eficienţa proteică cu 22%, raportul proteic a crescut cu 79%.

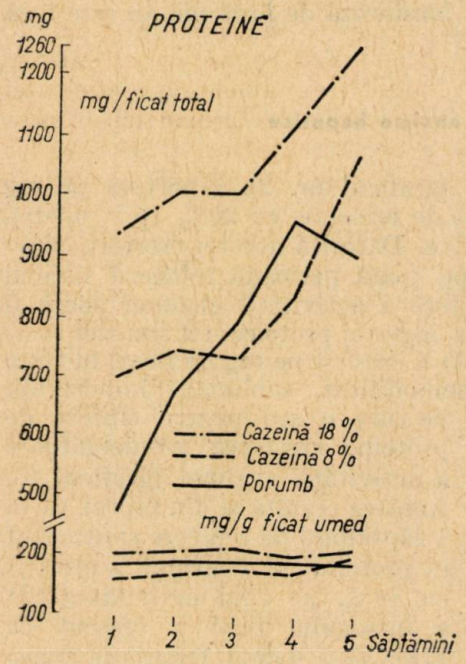
În perioada restabilirii, ingesta a prezentat o tendinţă de creştere, menţinîndu-se totuşi sub nivelul loturilor cu cazeină. Astfel, în medie loturile cu cazeină 18 sau 8% au ingerat cu 37% ($p < 0,001$) şi, respectiv, cu 45% ($p < 0,001$) mai mult decît lotul în restabilire. Trebuie subliniat faptul că ingesta la lotul în refacere a fost mai scăzută decît la loturile care au primit cazeină şi în cazul cînd comparaţia s-a făcut pentru o greutate corporală similară (săptămîna a patra de restabilire corespunzînd cu săptămîna a cincea la lotul cu 18% şi cu săptămîna a şasea la lotul cu 8% cazeină). La sfîrşitul perioadei de restabilire, ingesta a fost cu 27% ($p < 0,001$) mai mare la lotul cu 18% cazeină şi cu 45% ($p < 0,001$) la cel cu 8% cazeină.

Eficienţa proteică a prezentat de asemenea o tendinţă de creştere în perioada de refacere, după 4 săptămîni valorile fiind cu 46% mai crescute ($p < 0,001$). Totuşi, la loturile care fuseseră supuse dietei maidice eficienţa proteică s-a menţinut în toată perioada de refacere mai scăzută decît la loturile cu cazeină. Astfel, la sfîrşitul perioadei de refacere lotul cu 18 % cazeină a prezentat o eficienţă proteică cu 23% ($p < 0,001$) mai mare, iar lotul cu 8% cazeină cu 61% ($p < 0,001$).

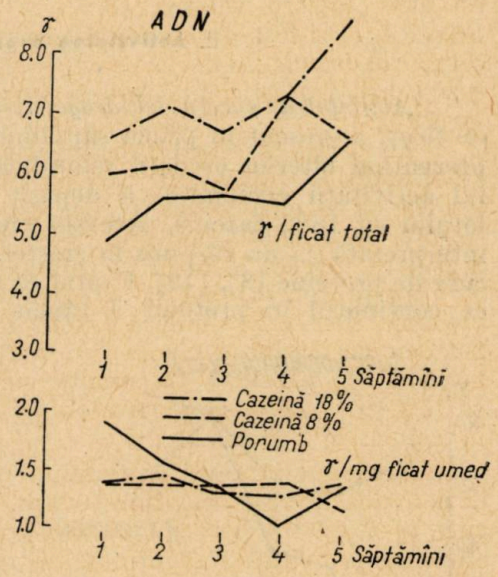
Greutatea ficatului a înregistrat în prima săptămînă o creştere importantă (38%), fiind după 4 săptămîni cu 84% mai mare ($p < 0,001$) decît înainte de restabilire. Diferenţa de 27%, înregistrată final, faţă de lotul cu 18% cazeină nu mai este semnificativă statistic ($p > 0,05$), în timp ce diferenţa de 38% în greutatea corporală a celor două loturi este semnificativă statistic ($p < 0,001$). Aceasta demonstrează că ritmul restabilirii greutăţii ficatului a fost mai bun decît cel al greutăţii corporale. Totuşi în perioada restabilirii, greutatea corporală a crescut cu 125%, iar greutatea ficatului cu 84%, ceea ce arată că regimul maidic a creat o disproporţie între greutatea corporală şi cea a ficatului, care s-a corectat în perioada refacerii.

Modificarea celulelor hepatice la foame şi realimentare a fost cercetată de unii autori [20] care au constatat că, proporţional cu scăderea greutăţii ficatului, a avut loc şi o reducere a volumului celulelor hepatice, iar la realimentare volumul acestor celule a redevenit normal. Din cercetarea de faţă reiese (graficul nr. 1) că în prima săptămînă de restabilire

greutatea ficatului a crescut datorită creşterii conţinutului în proteine şi în ceilalţi componenţi celulari, fără să aibă loc o înmulţire a numărului de celule hepatice. Aceasta reiese din faptul că greutatea ficatului a crescut în prima săptămînă de refacere cu 38% şi conţinutul total de proteine cu 42%, pe cînd ADN total din ficat a crescut doar cu 13%. Concluzia de mai sus reiese şi din concentraţia ADN pe mg de ficat (graficul nr. 2), care în prima săptămînă înregistrează o scădere de 21% ($p < 0,03$), iar



Graficul 1



Graficul 2

în săptămînile a doua şi a treia de 40—75% ($p < 0,001$). Cu începere din săptămîna a patra se constată o creştere semnificativă ($p < 0,001$) a concentraţiei ADN, care reflectă o proliferare a numărului de celule hepatice. Deşi concentraţia ADN pe mg de ficat în a patra săptămînă a ajuns la nivelul lotului normoproteic, conţinutul total în ADN a fost încă cu 29% mai scăzut, datorită greutăţii mai mici a ficatului (graficele nr. 1 şi 2).

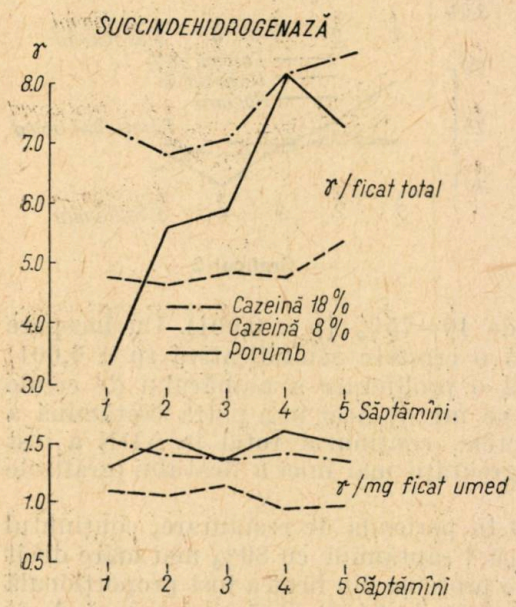
Sinteza de proteine a crescut în perioada de restaurare, conţinutul total de proteine din ficat fiind după 4 săptămîni cu 89% mai mare decît cel iniţial. Creşterea conţinutului de proteine din ficat a fost proporţională cu creşterea greutăţii ficatului (89 faţă de 84%), însă mai redusă decît creşterea greutăţii corporale (125%). La sfîrşitul perioadei de restabilire, conţinutul proteinelor din ficat a fost totuşi cu 40% mai mic decît la lotul normoproteic, corelîndu-se cu greutatea corporală, care a prezentat o diferenţă în minus de 38%. Trebuie subliniat că în timp ce conţinutul total de proteine al ficatului a crescut în toată perioada refacerii concentraţia proteinelor pe g de ficat nu s-a modificat. Acest fapt se poate corela

cu creşterea greutăţii ficatului în primele săptămîni de restaurare, fără a avea loc sporirea numărului de celule hepatice, respectiv a conţinutului în ADN.

Datele literaturii [2], referitoare la sinteza de proteine în deficienţa proteică arată că ar fi posibil ca mecanismul de biosinteză proteică să sufere defecţiuni, datorită cărora ar avea loc o perioadă de staţionare înainte de refacere. Faptul că în cercetarea de faţă nivelul proteinelor hepatice, deşi crescut după 4 săptămîni de restabilire, nu a atins nivelul martorilor cu 18% cazeină ar arăta că biosinteza de proteine nu este încă complet restabilită.

II. Activitatea unor enzime hepatice

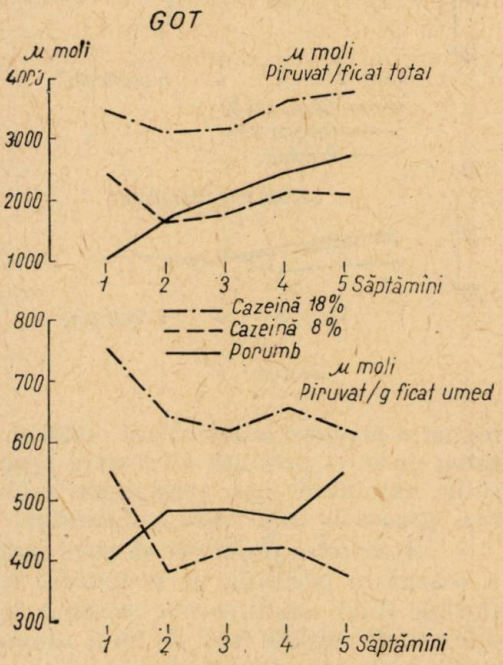
Activitatea succin-dehidrogenazei (graficul nr. 3), raportată pe mg de ficat, a crescut în prima săptămînă de refacere cu 20% ($p < 0{,}001$), prezentînd ulterior oscilaţii semnificative. Datorită acestei creşteri, nivelul activităţii enzimatice a depăşit pe toată perioada refacerii nivelul lotului cu 18% cazeină. Această creştere a activităţii enzimei poate fi interpretată ca un răspuns la creşterea ingestei proteice şi a sintezei crescute de proteine [3], [19]. Faptul că SD a crescut pe mg de ficat, în timp ce conţinutul în proteine a rămas nemodificat, subliniază importanţa pe care o are pentru sinteza de proteine creşterea premergătoare a activităţii enzimei (graficul 3). Aceasta rezultă şi din faptul că în 4 săptămîni de refacere conţinutul în proteine al ficatului a crescut cu 89%, pe cînd activitatea SD a întregului ficat a crescut cu 114% ($p < 0{,}001$). Diferenţa apare mai evidentă în prima săptămînă cînd proteinele din ficat au crescut cu 38%, iar activitatea SD cu 64%. Unii autori [16], studiind efectul asupra SD hepatice de postul urmat de realimentare, au găsit o revenire la normal a activităţii enzimei. Alţi autori [5] au observat că proporţia de glucide şi proteine din dieta de realimentare administrată după post a avut un efect marcat asupra activităţii dehidrogenazice. Astfel, ei au constatat că şobolanii care primeau o dietă cu 18% proteine prezentau activităţi dehidrogenazice de 4 ori mai mari decît acelea ale martorilor, care nu au postit. Aceasta arată necesitatea unui nivel adecvat de proteină din dietă pentru a umple piaţa metabolică la un nivel care va permite această rată de sinteză enzimatică.



Graficul 3

Williams [19], studiind schimbările ce survin în sistemul succinoxidazic într-o deficiență proteică prelungită urmată de realimentare, găsește o scădere a activității după 10 zile de depleție, urmată, după 30 de zile, de o creștere peste nivelul normal. După realimentare, activitatea SD revine la normal. Faptul că în cercetarea de față nivelul activității SD se menține crescut față de martori permite să se tragă concluzia că după administrarea timp de 5 săptămîni a unui regim maidic, instituirea unei diete normoproteice (18% cazeină) timp de 4 săptămîni nu a normalizat activitatea enzimei.

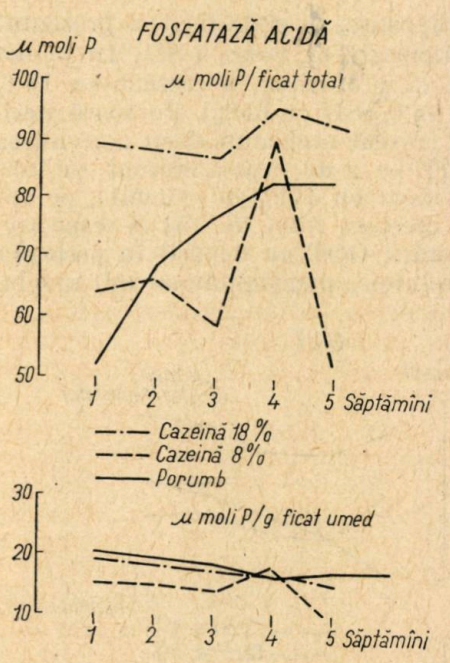
Activitatea GOT (graficul nr. 4), raportată la g de ficat, a prezentat în perioada refacerii o evoluție asemănătoare cu aceea a SD. În prima săptămînă activitatea GOT, raportată la g de ficat, a crescut cu 19% (SD cu 20%), iar pe întregul organ cu 64% (SD cu 65%). Pe toată perioada de restaurare, activitatea GOT a crescut mai mult decît activitatea SD. Astfel, în timp ce activitatea GOT pe g de ficat a crescut cu 36% ($p < 0{,}001$), activitatea SD a crescut doar cu 17% ($p < 0{,}001$), pe tot ficatul procentele corespunzătoare de creștere fiind de 151 și respectiv, 114%. Cu toate acestea, valorile activității GOT au depășit în perioada de refacere numai nivelul lotului hipoproteic, menținîndu-se sub nivelul regimului normoproteic. Aceasta arată că reacția de transaminare, care poate să reprezinte primul pas în transformarea metabolică a aminoacizilor în carbohidrați și acizi grași, a fost în mare măsură afectată de ratia maidică. Unii autori [14], [17] au constatat o scădere a activității GOT la regimuri hipoproteice, urmată de o refacere a activității enzimei la regimul normoproteic. Alți autori [15], studiind efectul depleției și al repleției proteice asupra activității unor enzime, printre care și GOT, au constatat o scădere a activității enzimei în carența proteică, fără ca după realimentare să aibă loc o revenire. Din studiul de față reiese că activitatea GOT nu s-a refăcut după trecerea animalelor de la regimul maidic la regimul cu 18% cazeină.



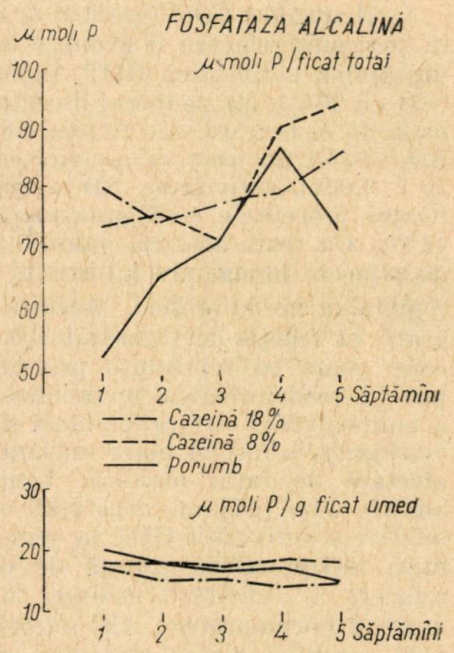
Graficul 4

Activitatea fosfatazei acide (graficul nr. 5), raportată la g de ficat, a prezentat în perioada refacerii o tendință de scădere, fără ca diferențele față de valorile inițiale să fie semnificative statistic. Activitatea enzimei prezintă o evoluție similară la lotul în refacere și la lotul normoproteic, diferențele dintre loturi fiind nesemnificative statistic. În interpretarea acestor rezultate trebuie să se țină seama de constatarea dintr-o lucrare ante-

rioară [7], şi anume că administrarea regimului maidic a determinat în primele 3 săptămîni o creştere a activităţii fosfatazei acide, valorile normalizîndu-se în săptămînile a patra şi a cincea. Faptul că în perioada restaurării activitatea enzimei a evoluat similar cu aceea a lotului normoproteic ar demonstra posibilitatea de adaptare prin refacerea activităţii fosfatazei acide chiar în condiţiile regimului maidic. Creşterea iniţială înregistrată în activitatea fosfatazei acide în timpul administrării unui regim maidic poate fi corelată cu alte cercetări [12], care constată la



Graficul 5



Graficul 6

foame o creştere a activităţii enzimei. Raportată la întregul ficat, activitatea enzimei prezintă o creştere proporţională cu aceea a greutăţii ficatului, rămînînd însă permanent sub nivelul lotului normoproteic datorită greutăţii mai mici a ficatului.

Activitatea fosfatazei alcaline (graficul nr. 6), raportată la g de ficat, a scăzut în perioada de restaurare cu 33%, diferenţele faţă de valorile iniţiale fiind semnificative statistic ($p < 0{,}001$). Această scădere face ca diferenţele iniţiale faţă de lotul normoproteic să dispară, activitatea fosfatazei alcaline devenind normală la sfîrşitul perioadei de refacere. Datorită greutăţii mai mici a ficatului, la sfîrşitul perioadei de restabilire activitatea fosfatazei alcaline pe întregul ficat este cu 37% mai redusă decît la lotul normoproteic. Rezultatele obţinute sînt în concordanţă cu datele din literatură [16] privitoare la efectul postului, urmat de realimentare asupra activităţii fosfatazei alcaline, în sensul că iniţial se constată un declin al activităţii enzimei, paralel cu pierderea proteinei hepatice, urmat de revenirea la normal după realimentare.

Din datele literaturii și din cercetarea de față, reiese importanța determinării modificărilor biochimice asociate cu realimentarea, pentru determinarea felului și a mărimii diferitelor răspunsuri care însoțesc tranzițiile metabolice.

CONCLUZII

1. Greutatea șobolanilor trecuți de la regimul maidic la un regim cu 18% cazeină administrat timp de 4 săptămîni este cu 37% mai scăzută față de martorul normoproteic (18% cazeină) și cu 30% față de martorul hipoproteic (8% cazeină)

2. Eficiența proteică, ca și ingesta, deși a crescut în toată perioada restaurării, s-a menținut sub nivelul loturilor cu cazeină.

3. Greutatea ficatului a prezentat în perioada de restaurare un ritm mai accentuat de creștere decît greutatea corporală, fără a atinge însă nivelul loturilor cu cazeină. Creșterea greutății ficatului a avut loc prin majorarea conținutului în proteine și a altor componenți celulari, fără a avea loc o înmulțire a numărului de celule, fapt care reiese din scăderea concentrației ADN pe mg de ficat în primele săptămîni ale acestei perioade.

4. Sinteza de proteine crește în perioada restaurării, conținutul total de proteine fiind final cu 89% mai mare, fără a atinge însă nivelul găsit în lotul normoproteic.

5. Activitatea SD raportată la întregul ficat a crescut cu 114%, depășind în toată perioada de restaurare nivelul lotului cu 18% cazeină, fără ca valorile să fi revenit la normal.

6. Activitatea GOT din ficatul total a crescut cu 151%, depășind nivelul lotului hipoproteic și menținîndu-se sub nivelul lotului normoproteic, ceea ce demonstrează că activitatea enzimei nu s-a refăcut.

7. Activitatea fosfatazei acide pe g de ficat a evoluat, în perioada restaurării, similar cu aceea a lotului normoproteic, iar a fosfatazei alcaline a scăzut cu 33%, ceea ce a dus la normalizarea activității enzimei.

Prezentată la redacție
la 15 noiembrie 1966

Secția de igiena alimentației,
Institutul de igienă,
București

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Protein intake and liver enzyme activity*, Nutrit. Rev., **20**, 280 (1962).
2. * * * *Protein depletion and aminoacid activation*, Nutrit. Rev., **21**, 344 (1963).
3. * * * *Threonine deprivation and protein synthesis*, Nutrit. Rev., **23**, 111 (1965).
4. * * * *Effects of fasting and refeeding on fatty acid synthesizing enzymes in liver*, Nutrit. Rev., **23**, 151 (1965).
5. Bruce E., Mc. Donald, B. Connor-Johnson, *Metabolic response to realimentation following chronic starvation in the adult male rat*, J. Nutrit., **87**, 161 (1965).
6. Dinu I., *Influența cantității și calității proteinelor asupra activității unor enzime din ficat*, St. cerc. biochim., **8**, 441 (1965).
7. Dinu I., *Studiul dinamic al influenței cantității și calității proteinelor asupra unor enzime hepatice*, St. cerc. biochim., **10**, 4 (sub tipar).
8. Gaetani S., A. M. Paolucci, M. A. Spadoin, G. Tomassi, *Activity of aminoacid activating enzymes in tissues from protein depleted rats*, J. Nutrit., **84**, 173 (1964).

9. Gonţea I., *Acţiunea pelagrogenă a porumbului*, Viaţa med., **V**, 97 (1958).
10. Gonţea I., P. Suţescu, V. Cosma, D. Cocora, *Cercetări asupra posibilităţilor de contracarare a efectului distrofiant al porumbului*, Igiena, **XI**, 281 (1962).
11. Gonţea I., P. Suţescu, *Acţiunea distrofiantă a porumbului şi posibilităţi de contracarare*, St. cerc. ig. sănăt. publ., 55—87 (1964).
12. Laron Zvi., Kowadle Avivah, *Serum acid phosphatase response to starvation and cortisone administration in rats*, Metabolism, **10**, 1 100 (1961).
13. Nielson R. R., H. M. Klitgaard, *Changes in succinic dehydrogenase activity related to feeding*, Amer. J. Physiol., **201**, 37 (1961).
14. Rosen F., N. Roberts, Ch. Nichol, *Increased activity of glutamic-pyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis*, J. biol. chem., **234**, 476 (1959).
15. Shan-Ming Chen, Yneh-Ting Kung, Ro-Han Ling, Cheh Sun, Chih-Chiyung, Chao-Wen Shen, Ying Lai Wang, *Protein metabolism. I. Effect of protein depletion and repletion on rat liver protein ribonucleic (RNA) and deoxyribonucleic (DNA) and on the activities of several liver enzymes.*, Chem. Abstr., **54**, 19 898 *a* (1960).
16. Soberon G., E. Sanchez, *Changes in effective enzyme concentration in the growing rat liver. 1. Effects of fasting followed by repletion*, J. biol. Chem., **236**, 1 602 (1961).
17. Som J. M., G. C. Esh, *Effect of pulse protein diets on the transaminase activity of plasma and other tissues in rats*, Amer. Biochem. Exptl. Med., **23**, 243 (1963).
18. Sporn A., A. Fostiropol, *Influenţa naturii proteinelor şi a unor vitamine asupra distrofiei maidice la cîine*, St. cerc. ig. sănăt. publ., 91 (1964).
19. Williams J. N., *Response of the liver to prolonged protein depletion. II. The succinic oxidase system and its component enzymes*, J. Nutrit., **73**, 210 (1961).
20. Zoletaeva T. A., *O nekotorih destruktivnih i vosstanovitelnih proţesah v peceni pri golodanii*, Biul. eksperim. biol. i med., **8**, 112 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 227–238 (1967)

CARACTERIZARE SPECTROFOTOMETRICĂ A ADN DUPĂ IRADIERE *IN VIVO*

I. COMPORTAREA FAŢĂ DE ACŢIUNEA UNOR AGENŢI DENATURANŢI (CĂLDURĂ, ACIZI, ALCALI)

MARIA FURNICA

577.11

Rezumat. — S-a extras ADN din ficatul şobolanilor iradiaţi cu 1 000 *r*, după 10 zile de la iradiere („perioada de restaurare"). Acest ADN a fost studiat, în comparaţie cu ADN normal sau cu ADN extras după 3 zile de la iradiere („perioada de distrugere"), prin următoarele teste: curba de absorbţie în U.V., E_{260}/E_{230}, E_{260}/E_{280}, E_{260}/E_{290}, denaturarea termică, incrementul de absorbţie la adaos de NaOH, coeficientul Thomas, curba de absorbţie la pH 3, curba de absorbţie la pH 12.

ADN extras după 10 zile de la iradiere se deosebeşte de ADN normal şi de ADN extras după 3 zile de la iradiere prin: efect hipercromic redus la denaturare termică; absorbţia crescută la 280 şi 290 mμ; efect hipercromic scăzut la adaos de hidroxid de sodiu. Se discută posibilităţile de interpretare a rezultatelor.

Studiul acţiunii radiaţiilor asupra macromoleculei de ADN se explică prin rolul major pe care ADN îl joacă în dirijarea funcţiilor celulei. Modificările structurale produse de iradiere sînt consecinţele schimbărilor chimice care, ulterior, afectează legăturile de hidrogen.

Există un mare număr de lucrări care pun în evidenţă modificările cantitative ale acizilor nucleici: în primele zile după iradiere are loc o scădere importantă a acestor acizi („faza de distrugere"), după care urmează o tendinţă de revenire spre valori normale („faza de restaurare") [1], [2]. Această revenire poate să se definitiveze, în cazul iradierii cu doze mai reduse, sau poate fi numai trecătoare, în cazul administrării unor doze letale de radiaţii.

Studiile calitative ale ADN se referă în general la modificările imediate sau din primele 2–3 zile după iradiere („faza de distrugere") şi au fost puse în evidenţă după iradierea animalelor de laborator, urmată de sacrificarea lor şi de extragerea, purificarea şi caracterizarea sub diverse aspecte fizico-chimice a ADN din diverse ţesuturi. Astfel s-au putut constata următoarele modificări fizico-chimice importante:

1. Scăderea fracţiunii de ADN înalt polimerizat în favoarea fracţiunii oligonucleotidice din măduvă la iepuri iradiaţi cu 2 000 *r* [3].

2. Scăderea gradului de polimerizare, măsurată prin modificarea viscozităţii [4].

3. Reducerea greutăţii moleculare a ADN extras din ţesuturile radiosensibile (timus, splină) ale şobolanilor iradiaţi cu 1 000 *r* şi sacri-

ficați după 24 de ore. Efectul radiațiilor asupra acestui ADN s-a pus în evidență prin solubilitatea lui crescută în soluții saline diluate. În organele radiorezistente (ficat, rinichi) nu se constată aceste modificări [5].

4. Solubilitatea crescută în NaCl 0,4 M și 0,6 M a dezoxinucleoproteinei extrase din organe radiosensibile după 24 de ore de la iradierea șobolanilor cu 1 000 *r* [6].

5. Labilizarea legăturii ADN-proteină în țesuturile radiosensibile, dar nu și în cele radiorezistente [6].

6. Sinteza ADN *in vitro*, utilizînd ca „templet" un ADN extras din țesut iradiat, diferă de aceea realizată în prezența unui „templet" de ADN neiradiat. Acest ADN anormal, sintetizat cu „templete" lezate de iradiere, este o reflectare a diferitelor schimbări chimice suferite de molecula de ADN iradiat [7].

Schimbările produse de iradiere asupra acizilor nucleici au fost puse în evidență cel mai bine în soluții apoase [8]. Unul din efectele majore ale iradierii este denaturarea, exprimată în special prin ruperea legăturilor de hidrogen. Alte efecte observate la iradierea soluțiilor apoase sînt: formarea hidroperoxizilor [9], distrugerea bazelor sau scindarea lanțului polinucleotidic cu liberare de grupări fosforice libere [10].

În lucrarea de față ne-am pus problema caracterizării sub aspect calitativ a acidului dezoxiribonucleic refăcut în organismul iradiat, care se găsește în așa-zisa „fază de restaurare". Sub aspectul general, se știe că în această perioadă au loc unele procese de reparație a radioleziunilor, în urma stimulării sintezei proteice [11], o tendință temporară sau definitivă de refacere a leucocitelor distruse etc. Blair [12] a formulat o teorie a răspunsului mamiferelor la iradiere, în care presupune că radioleziunea are o componentă trecătoare sau reparabilă și una permanentă sau reziduală, cumulativă proporțional cu doza primită.

Propunîndu-ne să caracterizăm sub aspect calitativ ADN extras din ficatul animalelor iradiate cu 10 zile mai înainte, am ales ca test determinarea spectrelor de absorbție în ultraviolet. Beaven, Holiday și Johnson [13] consideră că pentru caracterizarea fizico-chimică a ADN determinarea spectrelor de absorbție în U.V. prezintă o importanță comparabilă cu determinările de viscozitate și de constantă de sedimentare. Testele de spectrofotometrie utilizate de noi pun în evidență modificările structurale intercatenare, adică produse la nivelul legăturilor de hidrogen care leagă bazele complementare, sub acțiunea agenților denaturanți (căldura, acidifierea, alcanizarea etc.).

MATERIAL ȘI METODĂ

Experiențele au fost efectuate pe șobolani Wistar, iradiați cu doza de 1 000 *r*, doză la care din experiențe anterioare cunoșteam modificările cantitative ale ADN din ficat [2]. Animalele au fost sacrificate după 10 zile de la iradiere pentru a se extrage ADN. În paralel, s-a studiat și ADN din ficatul animalelor iradiate și sacrificate după 3 zile de la iradiere, precum și ADN de la animale normale.

1. Extracția ADN s-a efectuat prin metoda Zamenhof-Griboff-Marillo, căreia i-am adus mici modificări, din cauza comportării diferite la extragere a ADN din țesuturile iradiate, față de cel din țesuturile normale [14]. Îndepărtarea finală a proteinelor s-a efectuat prin trei agitări succesive cu amestec cloroform-alcool octilic, urmate de centrifugări timp de 5 min la 1 000 t/min, în supernatantul final s-a efectuat ultima precipitare a ADN cu alcool etilic. Fibrele de ADN.

separate din soluție prin înfășurare pe o baghetă de sticlă, s-au suspendat prin agitare ușoară în NaCl 1 M. Stocarea ADN s-a făcut la 4°C în soluție de 3—7 mg ADN/ml.

2. Dozarea ADN în preparat s-a efectuat prin metoda cu difenil-amină, determinînd absorbția la lungimile de undă de 610 și 650 mμ.

3. ARN prezent ca impuritate în preparatul de ADN s-a dozat prin metoda cu orcină, efectuînd citiri la 600 și 660 mμ. Din cauza intervenției ADN în reacția cu orcină, rezultatele s-au controlat și prin stabilirea unei curbe etalon de ADN de diferite concentrații, în prezență de orcină. În condițiile experienței noastre, ADN prezent în reacția cu orcină produce o extincție variind între 0,007 și 0,014, în funcție de cantitatea de ADN din preparat. În general, preparatele noastre de ADN au conținut cam 1,3 g ARN/100 g ADN.

4. Dozarea proteinei s-a efectuat prin metoda Lowry, folosindu-se ca etalon o soluție de albumină serică bovină (produs Sigma). Citirile s-au efectuat la lungimea de undă de 750 mμ. Preparatele noastre au avut în general între 1 și 1,3 g proteină/100 g ADN. După tratare cu amestec deproteinizant, reacția Lowry a fost în permanență negativă, impuritățile proteice situîndu-se sub limita de sensibilitate a metodei de lucru.

5. Recunoașterea și aprecierea cantității de ADN denaturat, prezentă în preparatul de ADN nativ, s-au efectuat cu ajutorul clorurii de magneziu [15]. Aplicînd formula :

$$100 \cdot \frac{(E_{Na} - E_{Mg})\ \text{nativ}}{(E_{Na} - E_{Mg})\ \text{denat.}} = x\ \%\ \text{ADN denaturat},$$

putem afla gradul de denaturare al preparatelor respective în timpul operațiilor de laborator. Cantitatea maximă de ADN denaturat găsită în preparatele native de ADN a fost de 2% (tabela 1).

Tabela 1

Controlul calității preparatelor de ADN cu ajutorul probei Shack

Starea preparatului	E_{260}	$E_{Na} - E_{Mg}$
ADN nativ	0,1314	—
ADN nativ + $MgCl_2$	0,1310	0,0004
ADN denaturat *	0,1489	—
ADN denaturat + $MgCl_2$	1,0310	0,0179

* %ADN denaturat în preparatul nativ $= 100 \cdot \frac{0,0004}{0,00179} = 2\%$.

6. Curba de absorbție în ultraviolet s-a determinat la aparatul CF_4 Optica Milano, între 220 și 320 mμ. Soluția stoc a fost diluată la 10 μg ADN/ml, în NaCl 0,01 M, iar citirile s-au efectuat în cuve de cuarț cu drum optic de 1 cm și volum de 3 ml.

7. Denaturarea termică s-a efectuat prin încălzire pe baia de apă a soluției de ADN în eprubete cu dop de sticlă timp de 1 oră. Aceleași rezultate s-au obținut la denaturarea timp de 10 min.

8. Incrementul de absorbție s-a efectuat prin adaos de NaOH 6 M în cuvele spectrofotometrului și citirea absorbției la 260 mμ înainte și după alcalinizare în preparatul nativ și în cel denaturat termic. Corecția de volum după adaosul de hidroxid de sodiu și diferența de absorbție la 260 mμ între preparatul inițial și cel tratat cu NaOH constituie „incrementul de absorbție" al preparatului respectiv [16].

9. Coeficientul Thomas [13] se exprimă prin raportul absorbțiilor la 260 mμ ale preparatului de ADN la pH 3 și la pH 7.

10. Curba de absorbție a preparatelor de ADN denaturate prin modificarea pH-lui s-a efectuat după acidifierea cu HCl 1 N pînă la pH 3 sau după alcalinizare la pH 12 cu NaOH 1 N a soluțiilor native de ADN.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

1. *Curba de absorbție* a macromoleculei de ADN între 220 și 320 mμ (fig. 1) a avut maximul de absorbție la 259—260 mμ și minimum la 230 mμ pentru ADN extras din ficat normal și la 236 și 238 mμ pentru ADN extras de la animale iradiate. Cu ajutorul curbei de absorbție am calculat : raportul E_{260}/E_{230}, adică raportul dintre extincția maximă și minimă ; raportul E_{260}/E_{280}, sensibil la diferențele de compoziție bazică a diferitelor preparate ; raportul E_{260}/E_{290}.

Am constatat că raportul E_{260}/E_{230} are valori asemănătoare pentru ADN normal sau ADN_3 (adică extras după 3 zile de la iradiere), dar este mult mai scăzut pentru ADN_{10} (adică extras după 10 zile de la iradiere). Pentru concentrații egale de ADN această scădere este legată de o absorbție mai crescută a preparatului de ADN la 230 mμ (tabela 2). Aceeași absorbție mai crescută se observă și la 280 mμ. S-a

Tabela 2

Studiul absorbției în ultraviolet a preparatului de ADN extras din ficat de șobolan normal sau iradiat cu 1 000 r (după 10 și 3 zile de la iradiere)

Testul	ADN normal	ADN iradiat (10 zile)	ADN iradiat (3 zile)
λ max	260 mμ	260 mμ	260 mμ
λ min	230 mμ	238 mμ	232 mμ
E_{260}/E_{230}	0,213/0,103=2,06	0,202/0,187=1,14	0,167/0,087=1,90
E_{260}/E_{280}	0,213/0,122=1,74	0,202/0,155=1,38	0,167/0,096=1,73
E_{260}/E_{290}	0,213/0,055=3,87	0,202/0,119=1,79	0,167/0,045=3,71

constatat în general că absorbția la 280 mμ a unui preparat de ADN, față de absorbția la 260 mμ, nu este constantă, prezența unui procent mai mare de acizi guanilic sau citidilic producînd o intensificare a absorbției la 280 mμ [18]. Creșterea absorbției observată de noi ar putea, prin urmare, să reflecte o creștere a conținutului în guanină în acest ADN sintetizat de organismul iradiat cu 10 zile în urmă. Pentru a ne convinge că această creștere a absorbției nu este un artefact datorit unei impurități proteice (proteinele cu maximum de absorbție la 280 mμ), am determinat absorbția unei soluții de proteină în concentrație egală cu cea prezentă ca impuritate în preparatul nostru.

Am constatat în acest fel că prezența proteinei modifică numai cu 0,004 extincția la 280 mμ, deci în mod cu totul nesemnificativ.

2. *Denaturarea termică.* Este cunoscut faptul că sub acțiunea agenților denaturanți, cum este căldura, legăturile de hidrogen dintre cele două catene polinucleotidice ale ADN „nativ" se rup, rezultînd un ADN „denaturat", format dintr-o singură catenă. S-a pus în evidență că nu toate legăturile de hidrogen sînt la fel de puternice, unele desfăcîndu-se la temperaturi mai scăzute decît altele. Acest fapt a fost legat de etero-

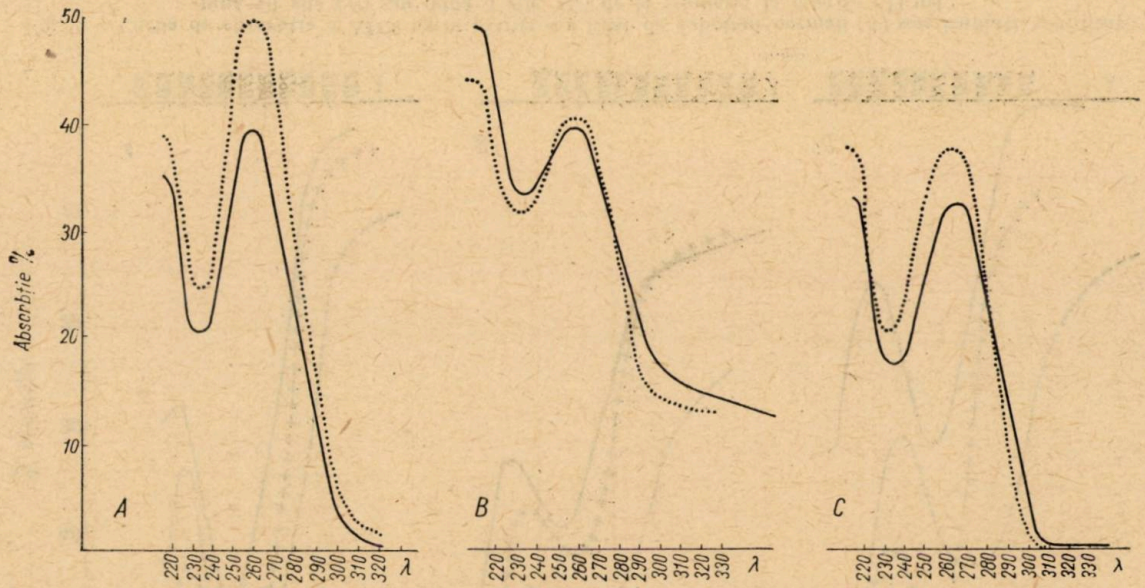


Fig. 1. — Curba de absorbție a ADN extras din ficat de șobolani normali (*A*) sau iradiați, sacrificați după 10 zile (*B*) sau după 3 zile (*C*) de la iradiere, supus denaturării termice :

——— ADN nativ

– – – – ADN denaturat termic

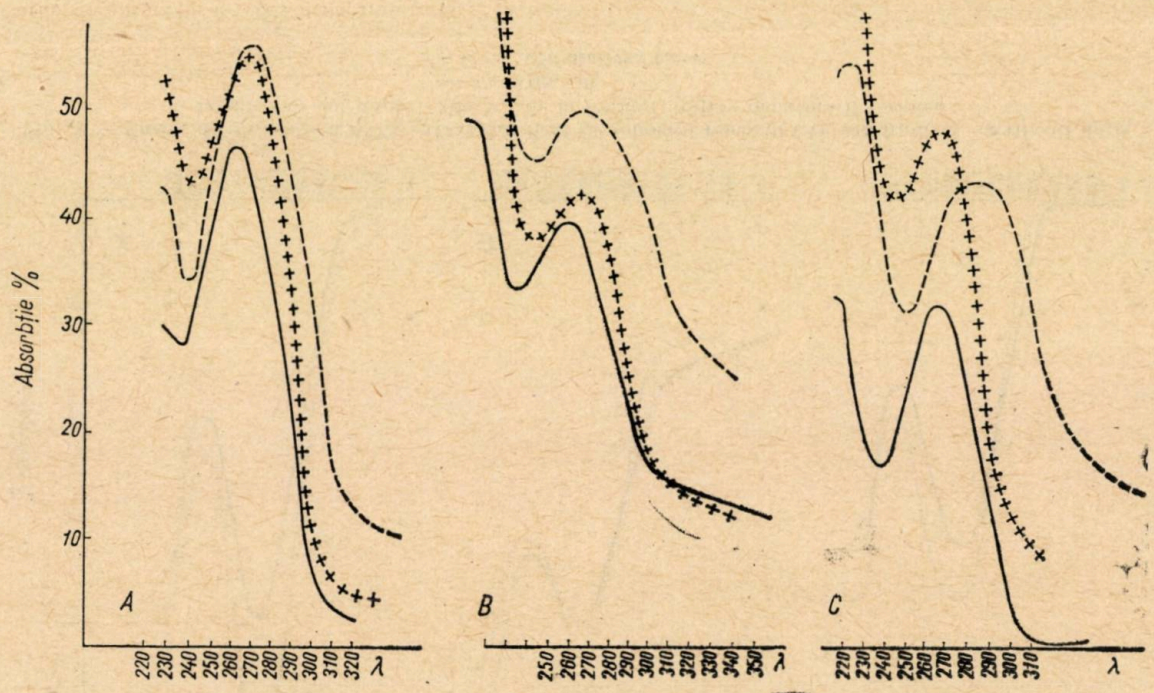


Fig. 2. — Curba de absorbție a ADN nativ extras din ficat de șobolani normali (*A*) sau iradiați, sacrificați după 10 zile (*B*) sau după 3 zile (*C*) de la iradiere, la diferite pH-uri :

——— ADN nativ la pH 7
– – – – ADN nativ la pH 3
+ + + + ADN nativ la pH 12

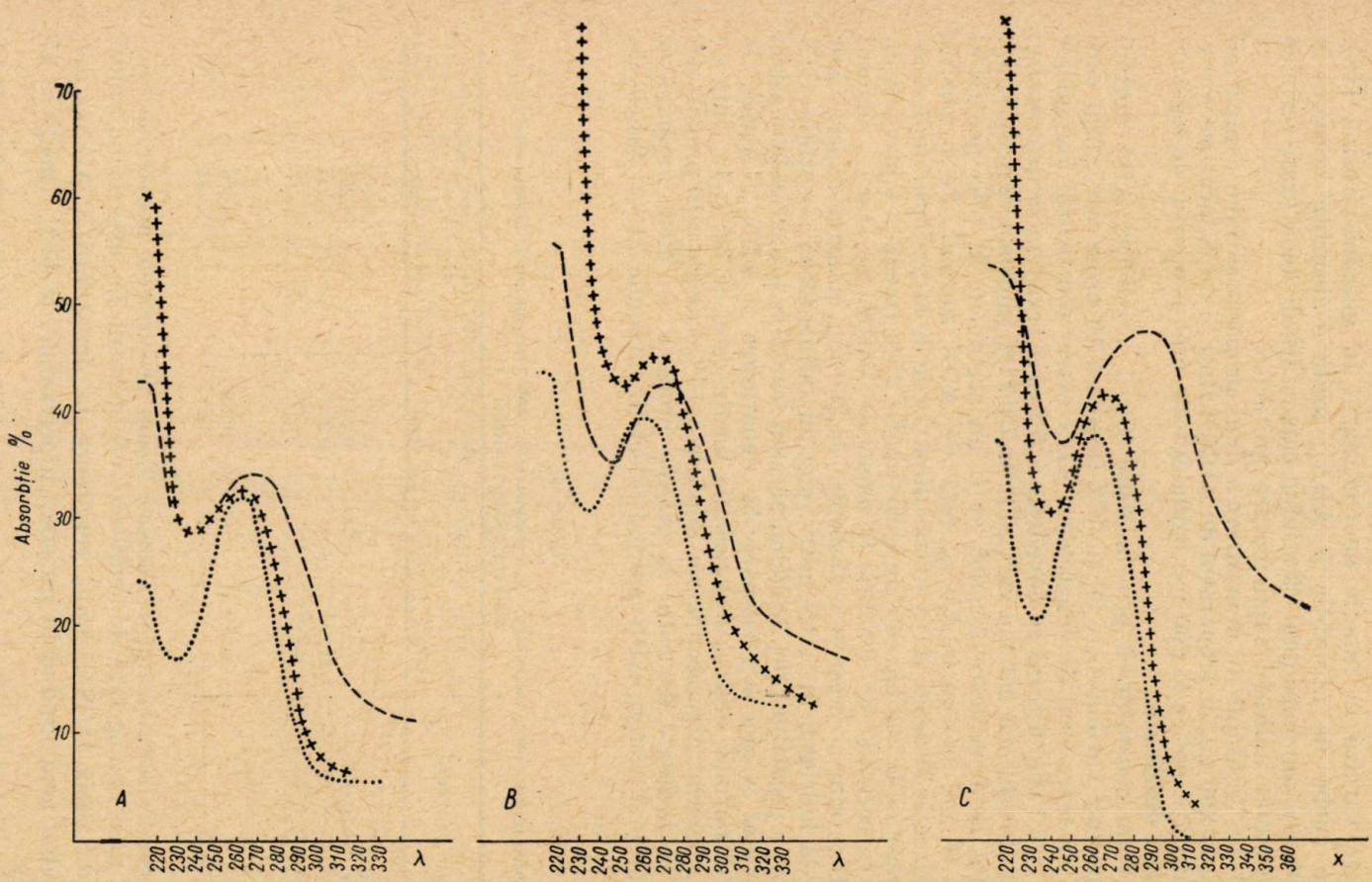


Fig. 3. — Curba de absorbție a ADN denaturat termic, extras din ficat de șobolani normali (*A*) sau iradiați, sacrificați după 10 zile (*B*) și după 3 zile (*C*) de la iradiere, la diferite pH-uri :

..... ADN denaturat termic la pH 7
– – – – ADN denaturat termic la pH 3
++++ ADN denaturat termic la pH 12

genitatea macromoleculei de ADN şi interpretat în sensul că gradul de denaturare variază în funcţie de conţinutul în guanină-citozină [18]. Deoarece curba de absorbţie a ADN_{10} arată o absorbţie crescută la 280 şi 290 mμ, am considerat că studiul capacităţii de denaturare termică ne poate aduce indicaţii suplimentare preţioase.

Măsura gradului de denaturare a unui preparat se face comparînd absorbţia la 260 mμ în preparatul de ADN înainte şi după încălzire. Creşterea densităţii optice la 260 mμ oglindeşte de fapt proporţia de legături de hidrogen desfăcute.

Noi am constatat că prin încălzire (fig. 1) absorbţia ADN normal creşte puternic variind între 30 şi 40 % (media a 10 preparate), fapt care exprimă un mare grad de denaturare. ADN extras din ficatul animalelor iradiate cu 10 zile în urmă se dovedeşte a fi foarte rezistent la denaturare, creşterea absorbţiei la 260 mμ variind între 7 şi 14 % (media a 12 preparate). Rezistenţa la denaturare termică ar fi un argument în plus pentru un conţinut G + C crescut în ADN_{10} faţă de ADN normal. Pe o poziţie intermediară se situează ADN extras după 3 zile de la iradiere, unde efectul hipercromic la 260 mμ este de aproximativ 25 % (media a 6 preparate).

3. *Incrementul de absorbţie la adaos de NaOH.* Se ştie că adaosul de NaOH produce o creştere a absorbţiei la 260 mμ, în urma ruperii unor legături de hidrogen în ADN nativ, dar nu influenţează absorbţia ADN denaturat în prealabil [16]. Aplicînd această reacţie la preparatele noastre, am constatat şi aici o rezistenţă la denaturare a ADN_{10}. Astfel, la preparatul normal, efectul hipercromic mediu este de 34 %, în timp ce la ADN_{10} efectul hipercromic nu depăşeşte 15 % (media a 10 preparate). Adaosul de hidroxid de sodiu la ADN_3 produce un efect asemănător cu cel observat asupra ADN normal (efect hipercromic 27 %) (tabela 3).

Tabela 3

Efectul hidroxidului de sodiu asupra absorbţiei în U.V. a preparatului de ADN extras din ficat de şobolan normal sau iradiat (după 10 şi 3 zile de la iradiere)

Starea preparatului	ADN normal		ADN iradiat (10 zile)		ADN iradiat (3 zile)	
	E_{260}	efect (%)	E_{260}	efect (%)	E_{260}	efect (%)
ADN nativ	0,213	—	0,206	—	0,167	—
ADN nativ + NaOH	0,287	+34	0,208	+3	0,202	+27
ADN denaturat	0,276	—	0,222	—	0,212	—
ADN denaturat + NaOH	0,276	0	0,229	+3	0,198	—
Increment de absorbţie						
ADN nativ	0,074		0,002		0,032	
ADN denaturat	0		0,007		0,014	

4. *Studiul coeficientului Thomas.* Toate preparatele noastre se comportă în mod analog faţă de acidifiere, coeficientul Thomas avînd valori apropiate (tabela 4). Mai mult, rezistenţa la denaturare a ADN_{10} dispare, mediul acid producînd un efect hipercromic de 44 % (media a 15 preparate).

5. *Studiul curbei de absorbţie a preparatelor de ADN la pH 3 şi pH 12.* Capacitatea acizilor şi alcalilor de a produce schimbări ireversibile în

molecula de ADN a fost observată pentru prima oară de I.M. Gulland și colab. (citați de [19]), care constată că aducerea unui preparat de ADN netiv la pH 2,5 sau 11,5 produce o puternică schimbare a viscozității, a birefringenței și a proprietăților optice. Interpretarea cea mai acceptată pentru aceste schimbări este desfacerea legăturilor de hidrogen dintre lanțurile polinucleotidice.

Tabela 4

Coeficientul Thomas în preparatul de ADN extras din ficat de șobolan normal sau iradiat (după 10 și 3 zile de la iradiere)

Starea preparatului	ADN normal		ADN iradiat (10 zile)		ADN iradiat (3 zile)	
	E_{260}	efect (%)	E_{260}	efect (%)	E_{260}	efect (%)
ADN nativ pH 7	0,207	—	0,202	—	0,167	—
ADN nativ pH 3	0,292	+37	0,292	+44	0,233	+39
ADN denaturat pH 7	0,268	—	0,218	—	0,208	—
AD denaturat pH 3	0,268	0	0,236	+4	0,236	—
C.T. ADN nativ	1,41		1,44		1,39	
C.T. ADN denaturat	1,00		1,08		1,13	

În general, prin trecerea soluției de ADN normal de la pH 7 la pH 12 se produce o schimbare a formei curbei de absorbție în U.V., asemănătoare oarecum cu cea obținută în mediu acid (fig. 2*A*). Se constată o deplasare a absorbției maxime și minime spre lungimi de undă mai mari (270 și 240 mμ) la pH 3 (media a 10 preparate) și o intensificare generală a absorbției în urma eliberării grupărilor cromofore. Aceste afirmații sînt în general valabile și pentru ADN iradiat (fig. 2*B* și *C*) (media a cîte 10 preparate). Punerea în evidență a diferențelor cantitative dintre aceste curbe de absorție am făcut-o tot prin comparația raportului extincțiilor la anumite lungimi de undă (tabela 5).

Tabela 5

Absorbția în U.V. a preparatelor de ADN extrase din ficat de șobolan normal sau iradiat (după 10 și 3 zile de la iradiere) în urma denaturării acide (pH 3) și alcaline (pH 12)

Testul	ADN normal		ADN iradiat (10 zile)		ADN iradiat (3 zile)	
	pH 3	pH 12	pH 3	pH 12	pH 3	pH 12
λ max	270 mμ	256 mμ	264 mμ	260 mμ	271 mμ	262 mμ
λ min	240 mμ	236 mμ	244 mμ	240 mμ	240 mμ	240 mμ
E max/E min	1,15	1,28	1,14	1,14	1,52	1,20
E_{260}/E_{230}	0,92	1,07	0,94	0,98	1,16	0,90
E_{260}/E_{280}	0,96	1,49	1,07	1,39	0,98	1,50
E_{260}/E_{290}	1,09	2,38	1,19	2,21	1,10	3,13

Astfel, *la pH 12* (tabela 5), raportul E_{260}/E_{230} scade mult în valoare absolută (un urma creșterii absorbției la 230 mμ) la ADN normal și ADN_3 în comparație cu același raport la pH 7 (tabela 2) și nu se modifică la ADN_{10}.

Acest rezultat era de aşteptat din cauza rezistenţei la adaosul de hidroxid de sodiu a acestui preparat (pus în evidenţă la studiul incrementului de absorbţie).

Valorile absolute ale raportului E_{260}/E_{280} sînt mai puţin modificate la pH 12 faţă de pH 7. Diferenţe mai mari, care pun în evidenţă influenţa alcalinizării, apar la calcularea raportului E_{260}/E_{290}; sub acest aspect, diferenţele dintre ADN normal şi ADN_{10} sînt mai mici decît la pH 12.

Raportul E_{max}/E_{min}, aproximativ egal în valoare absolută pentru cele trei categorii de preparate, apar mai scăzut decît la pH 7 pentru ADN normal şi ADN_3 dar nemodificat în cazul ADN_{10}.

La pH 3 valorile absolute ale rapoartelor E_{260}/E_{230}, E_{260}/E_{280} şi E_{260}/E_{290} nu diferă cu natura ADN sau lungimea de undă, menţinîndu-se la valori destul de constante, cuprinse între 0,92 şi 1,16. Amintim că la pH 7 limitele de variaţie a acestor rapoarte se situează între 1,48 şi 3,71. Deci, în mediu acid toate preparatele se comportă identic, dispărînd diferenţa dintre ele. Acest rezultat era de aşteptat, căci coeficientul Thomas a avut valori egale pentru toate preparatele, iar efectul hipercromic la 260 mμ a fost foarte apropiat.

În mediu acid, ca şi în mediu alcalin, aceste rapoarte — faţă de pH 7 — au valori mult reduse pentru ADN normal sau ADN_3, în timp ce ADN_{10} rămîne nemodificat.

6. *Studiul curbei de absorbţie a preparatelor de ADN denaturate termic şi aduse la pH 3 sau pH 12.* Pentru a putea diferenţia modul în care adiţia de acizi şi alcali acţionează ca agent denaturant asupra macromoleculei de ADN, în comparaţie cu căldura, am trasat curba de absorbţie a preparatelor denaturate termic şi supuse ulterior modificărilor de pH. În general, pe aceste preparate modificările produse de acidifiere sau alcalinizare sînt mai mici decît la preparatele native (fig. 3) (media a cîte 5 determinări). Numai la ADN_{10} efectul alcalinizării este mai pronunţat în preparatul încălzit decît în cel nativ. Faptul se explică prin aceea că cei doi agenţi acţionează oarecum aditiv asupra ADN_{10}, în timp ce la ADN normal încălzirea a produs desfacerea aproape totală a catenelor, încît influenţa ionilor H^+ sau OH^- se resimte mai puţin.

Toate experienţele prezentate mai sus au pus în evidenţă unele diferenţe de comportare, faţă de agenţii denaturanţi, ale ADN după iradiere *in vivo*. Rezistenţa crescută la acţiunea căldurii apare numai la ADN extras după 10 zile de la iradiere. Explicarea rezistenţei crescute la denaturarea termică necesită o serie de studii suplimentare. Deocamdată nu putem decît să enumerăm diversele ipoteze posibile:

— ADN este rezistent la condiţiile obişnuite de încălzire (90°C, 10 min) şi necesită o temperatură mai ridicată. Din literatură se ştie că preparatele de ADN cu un conţinut crescut de guanină + citozină se denaturează mai greu [18]. S-ar putea presupune că în acest ADN nou sintetizat raportul GC/AT este crescut.

— ADN nou sintetizat are o structură ramificată care îngreuiază desfacerea legăturilor de hidrogen intercatenare sub acţiunea căldurii. În acest caz, numai studiile de microscopie electronică pot lămuri problema [20].

— Ipoteza renaturării rapide a ADN după denaturare prealabilă prin încălzire nu pare valabilă, deoarece ADN extras din țesuturile mamiferelor, spre deosebire de cel al microorganismelor, nu se renaturează.

Cît privește ADN din faza de distrugere ADN_3, pe care noi l-am studiat pentru a avea un termen de comparație cu faza de restaurare, constatăm că el nu suferă modificările pe care le găsim la ADN_{10}. Am arătat la începutul lucrării că efectul timpuriu al radiațiilor asupra ADN iradiat *in vivo* se manifestă în special asupra gradului de polimerizare ; acum se produc ruperi de legături internucleotidice, cu scurtarea uneia sau a ambelor catene. Aceste modificări au fost puse în evidență prin determinarea greutății moleculare, a viscozității etc., dar ele nu influențează comportarea față de acțiunea agenților denaturanți, care este sensibilă la alt gen de modificări fizico-chimice. Rezultă din experiențele noastre că acest ADN_3, iradiat *in vivo*, nu-și modifică stabilitatea helixului sub acțiunea unor agenți denaturanți cu altă intensitate decît un ADN normal.

Concluzia principală care se degajă din experiențele noastre este că, la 10 zile după iradiere *in vivo*, găsim în ficatul șobolanilor iradiați un ADN care se deosebește atît de ADN normal, cît și de ADN care a suferit acțiunea directă a radiațiilor. Acest ADN_{10} se caracterizează sub aspect spectrofotometric prin :

1) rezistență crescută la denaturare termică ;

2) efect hipercromic redus la adaos de hidroxid de sodiu ;

3) absorbție crescută la 280 și 290 mμ.

Cercetările noastre de viitor vor încerca să explice rezistența la denaturarea termică a ADN extras după 10 zile de la iradiere și vor urmări în continuare comportarea lui la acțiunea altor agenți denaturanți.

Prezentată la redacție
la 28 noiembrie 1966

Institutul oncologic,
București

BIBLIOGRAFIE

1. J. M. Bacq, P. Alexander, *Principes de Radiologie*, Masson, Paris, 1955.
2. O. Costăchel, M. Furnică, G. Furnică, O. Popovici, *Variațiile acizilor nucleici în țesuturi iradiate sub protecție cu AET*, St. cerc. biochim., **3**, 21 (1960).
3. G. A. Kritski, P. H. Safronova, T. Kobtum, S. Mîrlina, L. F. Malișeva, *Izmenenie svoitv DNK kostnogo mozga posle rentgennogo oblucenia jivotnogo*, Biohimiia, **29**, 701 (1964).
4. N. Mori, *Physico-chemical studies on DNA irradiated with ionizing radiations*, Nuclear Sci. Abstr., **19**, 11 (1966).
5. R. D. Bauer, W. Loring, N. B. Kurnick, *Studies of DNA of irradiation damaged nucleoprotein*, Radiat. Res., **26**, 507 (1965).
6. R. D. Bauer, K. Dreher, N. B. Kurnick, *Effect of in vivo X-irradiation on nucleoprotein stability*, Radiat. Res., **20**, 24 (1963).
7. S. Okada, *Incorporation of H^3-thymidine and H^3-deoxycytidylic acid into DNA after irradiation of the DNA primer with γ-rays*, Nature, **185**, 193 (1960).
8. J. J. Weiss, *Chemical effects of ionizing radiation on nucleic acids and related compounds*, în *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 3, Academic Press, New York, 1964, p. 102.
9. G. Scholes, J. Weiss, C. M. Wheeler, *Formation of hydroperoxides from nucleic acids by irradiation with X-rays in aqueous solutions*, Nature, **178**, 157 (1956).

10. B. Collins, S. Okada, G. Scholes, J. J. Weiss, C. M. Wheeler, *Chain scission and hydrogen bond breakage on irradiation of DNA*, Radiat. Res., **25**, 526 (1965).
11. N. F. Sommer, J. H. Görtz, E. C. Maxie, *Prevention of repair in irradiated Rhizopus stolonifer sporangiospores by inhibitors of protein synthesis*, Radiat. Res., **24**, 390 (1965).
12. H. A. Blair, *A formulation of the relation between radiation dose and shortening of life span*, în *Peaceful uses of Atomic Energy, 1955, Geneva*, **11**, 118 (1956).
13. G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, *Optical properties of nucleic acids and their components*, în E. Chargaff, J. N. Davidson, *The Nucleic Acids*, vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 493.
14. M. Furnică, El. Popa, O. Popovici, *Acțiunea ADN extras dih țesuturi normale și iradiate asupra activității catalazei hepatice. Nota I*, St. cerc. biochim., **8**, 43 (1965).
15. J. Shack, *On the recognition and estimation of denaturated DNA*, J. biol. Chem., **233**, 677 (1958).
16. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzimology*, vol. 3, Academic Press, New York, 1959, p. 710.
17. A. Fleck, H. N. Munro, *RNA estimations by UV absorption*, Biochim. Biophys. Acta, **55**, 573 (1962).
18. J. Marmur, P. Doty, *Determination of the base composition of DNA from its thermal denaturation temperature*, J. mol. Biol., **5**, 109 (1962).
19. D. O. Jordan, *The Chemistry of Nucleic Acids*, Butterworth, Londra, 1960, p. 249.
20. N. N. Das Gupta, M. Sarkar, D. N. Misre, *Electronic microscopic studies on denaturated DNA from E. Coli*, J. mol. biol., **15**, 619 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., **10**, *3*, 239–245 (1967)

INFLUENȚA SULFOCARBONISMULUI CRONIC ASUPRA UNOR ASPECTE ALE METABOLISMULUI LIPIDIC LA ȘOBOLANI

I. GONȚEA, M. ANDREI, D. POPESCU și GH. WASERMAN

547.915.5

Rezumat. — Experiențele efectuate pe 6 loturi de cîte 16 șobolani albi, supuși unui regim izoproteic (16g%), conținînd drojdie de bere (ca sursă de complex B) în proporții diferite (2, 6, 10 g%), au arătat că injectarea (s. c.) timp de 15 săptămîni a 100 mg sulfură de carbon pe kilocorp din două în două zile a determinat creșterea cu 39% a colesterolemiei ($p < 0,001$), a mărit cu 19% greutatea ficatului ($p < 0,001$), a micșorat cu 47% conținutul acestui organ în fosfolipide ($p < 0,001$) și a redus cu 43% activitatea fosfatazei alcaline din același organ ($p < 0,001$).

În timp ce efectul hipercolesterolemiant nu a fost influențat de mărimea aportului de vitamine B, cel hepatodistrofiant a putut fi în mare măsură contracarat sau atentuat prin majorarea disponibilului în aceste vitamine.

Deși încă din al patrulea deceniu al secolului nostru s-a semnalat că sulfura de carbon provoacă modificări în fracțiunile lipidice din sînge [2], interesul față de acest efect nu a apărut decît în ultimii 10 ani, o dată cu creșterea morbidității și mortalității prin ateroscleroză și cu aprofundarea cunoștințelor asupra relației dintre această boală și metabolismul lipidelor. În cîteva anchete medicale s-a observat că incidența dislipidemiei și a tulburărilor aterosclerotice este mai mare la bolnavii de sulfocarbonism cronic și printre persoanele expuse acestei noxe.

Determinîndu-se concentrația colesterolului și fosfolipidelor din sînge la 129 de persoane expuse timp îndelungat unor toxice industriale, s-a constatat că, în comparație cu valorile găsite la un grup martor (15 persoane sănătoase), muncitorii (40) care lucrau într-un mediu cu sulfură de carbon au prezentat hipercolesterolemie și hipofosfatemie (11). În alte cercetări efectuate pe 182 de bărbați comparabili ca vîrstă, dintre care 103 expuși aproape permanent la sulfură de carbon și 79 fără contact cu această noxă, s-a găsit că în grupul expus modificările în vasele retinei și ale inimii (EKG), hipertensiunea și dislipidemia (hipercolesterolemia cu creșterea atît a raportului dintre colesterol și fosfolipide, cît și a celui dintre β- și α-lipoproteine), au fost mai frecvente decît în grupul martor [13]. Rezultatele unei lucrări efectuate pe 50 de bărbați dintr-o fabrică de textile, unde concentrația medie a sulfurii de carbon în atmosf ra locului de muncă era de 200γ la litru de aer, și rezultatele la 35 sau 22 de persoane expuse acestei noxe de cel puțin 5 ani arată că pentru aceeași

vîrstă incidenţa hipercolesterolemiei cu creşterea β-lipoproteinelor a fost mai mare în grupele expuse decît în cele de control [15], [21], [22].

Într-o altă cercetare s-a urmărit influenţa sulfurii de carbon prin determinarea fotometrică a turbidităţii serului imediat înainte, după 6 şi după 8 ore de la ingerarea în timp de 15—20 min, pe nemîncate (de 12—14 ore), a unui mic dejun care conţinea 80 g grăsime animală (unt, slănină). Aplicîndu-se acest test la trei grupe de persoane (muncitori expuşi la sulfură de carbon într-o fabrică de vîscoză, bolnavi de ateroscleroză şi persoane sănătoase), în total 295 de oameni, s-a constatat că valoarea medie găsită după 8 ore la muncitorii cu peste 5 ani vechime în acelaşi loc de muncă a fost cu 65% mai mare decît la cei sănătoşi (3,74 faţă de 2,26), iar cea obţinută la 44 de muncitori cu sulfocarbonism cronic (6,78) s-a apropiat de media (8,40) stabilită la 17 bolnavi cu leziuni coronariene [17].

Rezultatele investigaţiilor clinice şi biochimice referitoare la acţiunea aterogenă a sulfurii de carbon sînt susţinute de unele fapte observate în experienţe pe iepuri şi pe şobolani. Comparîndu-se efectul ingestiei de colesterol cu acela al injectării (i.m.) a 6 mg sulfură de carbon pe kilocorp şi pe zi timp de 30, 60 şi 90 de zile, s-a constatat că noxa provoacă modificări similare celor care apar după ingestia de colesterol, cu deosebirea că la animalele cărora s-a administrat această substanţă lipidele totale au crescut procentual mai mult în ser decît în aortă, pe cînd la cele cu sulfocarbonism faptul s-a petrecut invers. Administrarea intramusculară a aceleiaşi doze de sulfură de carbon (6 mg/kilocorp/zi) la iepuri care ingerau zilnic cu hrana cîte 0,5 g colesterol a grăbit şi a intensificat atît hipercolesterolemia, cît şi apariţia leziunilor de ateroscleroză. Recent s-a semnalat că în ultimele 2 săptămîni de intoxicare conţinutul serului în acizi graşi neesterificaţi la şobolani expuşi (cîte 5 ore pe zi, de 6 ori săptămînal, timp de 7 luni) să respire într-o atmosferă cu sulfură de carbon (1,6 mg/l) a fost de 0,50 mg/l faţă de 0,37 în lotul martor şi activitatea lipolitică a peretelui aortei şobolanilor intoxicaţi a reprezentat numai 63% din cea găsită la animalele de control [7], [14], [24].

Dislipidemia constatată la iepurii intoxicaţi cu sulfură de carbon s-a atribuit tulburărilor provocate de această noxă în metabolismul lipidelor la nivelul ficatului. Lezarea acestui organ de către sulfura de carbon a fost observată atît în cercetări pe om, cît şi în experienţe pe animale. Prin explorarea funcţională a ficatului, la 18 bolnavi cu sulfocarbonism cronic s-a găsit că numai 2 au dat răspunsuri normale la diversele probe folosite, iar la 4 s-au obţinut rezultate intens pozitive [8], [9].

Expunerea iepurilor la sulfură de carbon (400 ppm) a mărit colesterolemia şi a provocat leziuni hepatice grave însoţite de scăderea considerabilă a conţinutului în glicogen. Cercetări efectuate pe cîini au arătat că la început apare hipertrofia ţesutului reticular, după care urmează o hepatită difuză cu infiltraţie perilobulară, iar stadiul final se caracterizează prin leziuni degenerative [9], 12].

Sulfura de carbon interferează activitatea mai multor enzime fie direct, fie chelînd unii efectori (activatori) metalici (cum sînt Zn, Mg, Mn), prin compuşii rezultaţi din reacţia noxei cu funcţia amină (ditiocarbamat, tioazolidin), care cu ionii polivalenţi din organism formează complexe

neionizabile şi micşorează disponibilul în aceste elemente, ca şi cum aportul exogen ar fi insuficient [4], [5], [18], [26]. Apoi prezenţa sulfurii de carbon pe piaţa metabolică măreşte nevoia organismului pentru unele vitamine din grupul B. În experienţe pe mai multe specii de animale (şobolani, cobai, iepuri), s-a constatat că sulfocarbonismul cronic micşorează conţinutul sîngelui şi al ficatului în tiamină şi în niacină, care formează cofermentul (cocarboxilaza, codehidrazele I şi II) mai multor enzime, iar prin majorarea aportului în aceste vitamine s-a obţinut atenuarea sau chiar prevenirea unora dintre simptomele intoxicaţiei [1], [3], [9], [19], [20], [23], [25].

Deşi atît reducerea capacităţii funcţionale a ficatului, cît şi tulburarea metabolismului lipidic pot fi atribuite disenzimiei provocate de sulfocarbonismul cronic, totuşi, ţinînd seama că această noxă, mărind nevoia organismului pentru unele vitamine din grupul B, realizează un dezechilibru nutriţional şi că acestea se însoţesc frecvent de distrofie lipidică (mai ales sub forma de hepatosteatoză), *spre a vedea în ce măsură dislipidemia şi tulburările hepatice se datoresc acţiunii directe a sulfurii de carbon sau insuficienţei disponibilului în vitaminele respective, am cercetat efectul ei asupra colesterolemiei şi asupra lipidelor hepatice, atît în cazul unei insuficienţe şi al unui surplus de vitamine B, cît şi în condiţiile unei diete adecvate.*

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru a ne convinge dacă sulfura de carbon are acţiune hipercolesterolemiantă, ca animal de experienţă am folosit şobolanul, care prezintă avantajul că, în condiţii obişnuite de trai, nu face ateroscleroză şi nu a fost utilizat de alţi cercetători în acest scop. Experienţele s-au efectuat pe 6 loturi de cîte 16 şobolani albi, tineri, apropiaţi ca greutate corporală (în medie 138 g) şi proveniţi din aceeaşi tulpină. Hrănirea animalelor s-a făcut cu o dietă izocalorică (4,5 kilocalorii/g), izolipidică (12 g%) şi izoproteică (16 g%), jumătate din materialul azotat provenind din cazeină, iar restul din gluten şi drojdie de bere. Grăsimile au fost reprezentate prin ulei de floarea-soarelui (*oleum helianthi*), care este bogat în acid linoleic necesar pentru metabolismul lipidelor, iar glucidele prin amidon. Aportul de elemente minerale, şi vitamine s-a asigurat prin amestecul salin sintetic (după formula lui Osborne şi Mendel) şi prin drojdia de bere folosită ca sursă de complex B, în proporţii diferite (2, 6 şi 10 g%). Vitaminele A şi D au provenit din *Oleum jecoris* (2g%), iar vitamina E s-a administrat sub forma de tocoferol pur (tabela 1).

Tabela 1

Compoziţia regimurilor (g%)

Ingredientul	Dieta I	Dieta II	Dieta III
Cazeină	10,00	10,00	10,00
Drojdie de bere uscată	2,00	6,00	10,00
Gluten	9,41	6,90	4,40
Oleum helianthi	10,00	10,00	10,00
Oleum jecoris	2,00	2,00	2,00
Amidon	60,59	59,10	57,70
Amestec salin (Osborne-Mendel)	2,00	2,00	2,00
Rumeguş	4,00	4,00	4,00
Total	100,00	100,00	100,00

Fiecare dietă cu același conținut în drojdie de bere s-a administrat la cîte două loturi de șobolani, dintre care unul a fost supus intoxicării și altul a servit ca martor. Spre a evita inegalitatea în cantitatea de hrană ingerată, șobolanii au fost alimentați în cuști individuale, prin administrarea de porții egale cu cea consumată de animalele intoxicate (procedeul *paired feeding*). Intoxicarea s-a realizat în 15 săptămîni prin injectarea subcutană a cîte 100 mg sulfură de carbon (în *oleum helianthi*) pe kilocorp, în primele 13 săptămîni, din 2 în 2 zile, și zilnic în ultimele două. Numărul total de injecții a fost de 63 pentru fiecare șobolan, ceea ce a reprezentat circa 1,2 g substanță activă pe animal sau 550 mg pentru 100 g corp. Pentru ca la interpretarea datelor obținute să se înlăture efectul stressului determinat de inocularea (înțepătura) *per se* și eventuala acțiune hipocolesterolemiantă sau protectoare exercitată de uleiul în care s-a administrat noxa, la animalele din lotul martor s-a făcut același număr de injecții cu *Oleum helianthi*, în cantitate egală cu cea utilizată ca solvent pentru sulfura de carbon administrată șobolanilor intoxicați. Animalele fiind luate în experiență din 4 în 4 zile, toți șobolanii au putut fi sacrificați după același număr de injecții. La sacrificare s-a recoltat sîngele în care s-a dozat colesterolul (prin procedeul Rappaport) și ficatul pentru determinarea fosfatazei alcaline (tehnica Franklin) și a conținutului în lipide totale (prin extracție cu eter în Soxhlet) și în fosfolipide (după Fiske și Subbarow).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din datele obținute la fiecare șobolan s-au calculat valorile medii și eroarea standard atît pentru fiecare lot separat, cît și pentru toate loturile intoxicate (I) și de control (M). Rezultatele sînt consemnate în tabela 2. Spre a vedea efectul sulfurii de carbon pentru fiecare indicator, s-au comparat valorile medii obținute în grupul celor trei loturi intoxicate (I) cu cele găsite în grupul loturilor martor (M). Rolul mărimii aportului de vitamine B s-a apreciat prin compararea valorilor medii obținute la fiecare lot în parte, contîndu-se numai pe deosebirile garantate de calculul statistic.

După cum indică datele din tabela 2, *valoarea medie a colesterolemiei la animalele intoxicate (I) a fost cu 39% mai mare decît la cele din lotul martor (81,4 față de 58,6 mg%)* și posibilitatea ca deosebirile să fie datorită hazardului este mai redusă ca $1^0/_{00}$ ($p < 0{,}001$). Diferențele dintre valorile medii ale loturilor intoxicate (I—III) nu prezintă siguranța revendicată de calculul statistic. Aceste fapte demonstrează că prezența sulfurii de carbon pe piața metabolică are efect hipercolesterolemiant, care se datorește acțiunii directe a noxei și nu este consecința dezechilibrului nutrițional ce ar putea rezulta în urma majorării nevoilor organismului pentru unele vitamine B.

Raportată la 100 g corp, *greutatea medie a ficatului* în grupul loturilor intoxicate (I) este cu 19% mai mare decît cea obținută pentru grupul loturilor de control (M) și deosebirea dintre valorile medii este puternic *semnificativă* ($p < 0{,}001$), ceea ce arată că sulfura de carbon a provocat hipertrofia hepatică. Comparînd greutatea ficatului la cele trei loturi intoxicate, se constată că ea a fost cu $27^0/_0$ mai mare la animalele din lotul alimentat cu dieta săracă în vitamine B decît la cele ce au dispus de aceste trofine ($p < 0{,}001$).

Concentrația lipidelor totale în substanța uscată a ficatului obținut de la șobolanii din loturile intoxicate (I) nu a fost semnificativ mai mare decît la cei din loturile de control (M), însă ficatul animalelor menținute la dieta hipovitaminică a conținut cu 53% mai multe grăsimi decît

Tabela 2

Efectul intoxicării cronice a şobolanilor cu sulfură de carbon asupra colesterolemiei şi a lipidelor hepatice în funcţie de mărimea aportului de vitamina B

Nr.	Lotul — Destinaţia	Drojdie de bere (g %)	Colesterolemie (mg %)	Ficatul: Greutate pentru 100 g corp (g)	Ficatul: Lipide (g %) substanţă uscată	Ficatul: Fosfolipide (g P) la 100 g lipide	Fosfatază alaclină (µMoli fosfat/g ficat umed)
I	Intoxicat	2	82,9±4,1	4,3±0,5	19,0±1,4	0,61±0,07	7,5±0,64
II	„	6	86,1±2,1	3,7±0,1	15,6±1,3	0,84±0,07	9,1±0,74
III	„	10	75,2±4,5	3,4±0,9	12,4±0,5	1,05±0,1	9,0±0,57
Media (I) Intoxicat			81,4±2,3	3,8±0,09	15,7±0,83	0,75±0,07	8,6±0,39
IV	Martor	2	57,7±3,3	3,4±0,1	16,0±1,5	1,17±0,1	14,5±0,76
V	„	6	58,1±2,5	3,1±0,09	14,1±1,1	1,81±0,2	15,2±0,53
VI	„	10	60,1±2,4	3,1±0,08	11,0±1,2	1,23±0,08	15,9±0,57
Media (M) Martor			58,6±2,8	3,2±0,05	14,0±0,85	1,40±0,08	15,2±0,06
Diferenţa dintre valorile medii ale loturilor intoxicate (I) şi martorului (M)			+39 %	+1,9 %		−53 %	−43 %
Semnificaţia diferenţelor dintre valorile medii: între I (intoxicat) şi M (martor)			p<0,001	p<0,01	p<0,13	p<0,001	p<0,001
între I şi III			p<0,23	p<0,001	p<0,001	p<0,005	p<0,009

al celor care au dispus de complex B ($p < 0,001$). Atît în grupul loturilor tratate cu sulfură de carbon, cît și în loturile martor, cantitatea de lipide totale din ficat a variat invers cu concentrația drojdiei de bere din regim, scăzînd pe măsură ce aceasta a crescut.

Conținutul ficatului în fosfolipide la animalele intoxicate (I) a reprezentat aproape numai jumătate (53%) din cantitatea găsită la șobolanii din loturile martor (I) și deosebirea dintre valorile medii prezintă un mare grad de siguranță ($p < 0,001$). În grupul loturilor intoxicate, concentrația fosfolipidelor în substanța uscată a ficatului a scăzut paralel cu proporția de drojdie de bere din hrană, fiind minimă pentru dieta hipovitaminică. În timp ce la animalele intoxicate (I) regimul bogat în vitamine (cu 10 g% drojdie) a favorizat formarea de fosfolipide, la cele neintoxicate (M) concentrația a fost maximă în lotul care a primit dieta cu 6 g drojdie, iar majorarea proporției acestui produs la 10 g% a micșorat conținutul ficatului în fosfolipide.

Valoarea medie a activității fosfatazei alcaline din ficatul șobolanilor intoxicați (I) a fost cu 43% mai redusă decît în loturile de martori (8,6 față de 15,2 Mmoli/g ficat) și deosebirea este puternic semnificativă ($p < 0,001$). La animalele neintoxicate, activitatea enzimei nu a fost influențată evident de mărimea proporției de drojdie din hrană, pe cînd la cele injectate cu sulfură de carbon valoarea găsită în lotul I menținut cu dietă săracă în vitamină B (2g% drojdie) a fost cu 17% mai redusă decît la șobolanii din loturile II și III care au dispus de aceste vitamine ($p < 0,009$).

Atît creșterea greutății ficatului, raportată la 100 g corp, cît și modificările apărute în conținutul lui în fosfolipide și în activitatea fosfatazei alcaline arată clar că sulfura de carbon afectează acest organ și că, pe lîngă efectul hipercolesterolemiant, ea exercită o importantă acțiune hepatodistrofiantă. În frapant contrast cu efectul hipercolesterolemiant, care nu a fost influențat semnificativ de disponibilul în complex B, cel hepatodistrofiant a putut fi în mare parte contracarat prin majorarea aportului de vitamine B.

Faptul că, pe măsură ce conținutul ficatului în lipide totale a crescut (invers proporțional cu concentrația drojdiei de bere din dietă), cel de fosfolipide a scăzut tinde să arate că distrofia hepatică s-ar datora tulburării procesului de convertire a grăsimilor neutre în lecitine. Deși apariția acestui efect se poate atribui scăderii activității fosfatazei alcaline și a altor enzime care participă la transportul fosforului, și mai ales interferării procesului de fosforilare oxidativă, totuși faptul că un surplus de vitamine B a atenuat semnificativ modificările hepatice cauzate de sulfocarbonism arată intervenția acestor vitamine, care, intrînd în constituția unor cofermenți (de exemplu NAD, NADP etc.), dacă sînt disponibile în cantități mai mari, favorizează restaurarea enzimelor inhibate. Prin efectul său hipercolesterolemiant, sulfura de carbon ar putea fi utilizată pentru obținerea unei dislipidemii experimentale și pentru studiul relației dintre tulburările metabolismului lipidic și apariția aterosclerozei.

Prezentat la redacție
la 11 noiembrie 1966

Secția de alimentație,
Institutul de igienă,
București

BIBLIOGRAFIE

1. Andreuzzi P., G. C. Maggi, *Sulla correlazione fra carenza tiaminica ed intossicazione sulfocarbonica nel ratto*, Acta Vitaminol., **13**, 103 (1959).
2. Bianchi E., *La lipemia nell intossicazione sulfocarbonica sperimentale*, Med. Lavoro, **29**, 213 (1938).
3. Cino J. A., *Vitamin B_1 in experimental intoxication with carbon disulfide*, Boll. Soc. ital. Biol. sper., **20**, 60 (1945).
4. Cohen, A. E., L. D. Schell, J. F. Kopp, F. R. Stokell (Jr.), R. G. Keenan, J. T. Mountain, H. J. Paulus, *Biochemical mechanisms in chronic carbon disulfide poisoning*, Amer. J. Hyg., **20**, 303 (1959).
5. Del Favero A., C. Pasotti, G. Robustelli, *Modificazioni enzimatiche nel siero, nel fegato e nella parete aortica in corso di intossicazione cronica con sulfuro di carbonio nel coniglio*, Gaz. intern. med. Chir., **69**, 1 883 (1964).
6. Franklin T. J., *The influence of age on the activities of some acid hydrolases in the rat liver and kidney*, Biochem. J., **82**, 118 (1962).
7. De Nicola P., F. Nicrosini, C. Pasotti, A. del Favero, *Ricerche comparative sul quadro fisiopatologico da intossicazione sperimentale prolongata con sulfuro di carbono e da dieta ipercolesterolica I. Studio delle frazioni lipidiche nel siero e nel aorta*, G. Geront., **3**, 207 (1962).
8. Granati A., L. Candia, *Il comportamento di alcuni tests di funzione epatica nel sulfocarbonismo cronico professionale*, Folia med. (Neapole), **39**, 864 (1956).
9. Harada J., *Effects of carbon disulfide inhalation*, Yonago Igaku Zasshi, **10**, 1 074 (1959).
10. Knobloch K., *Wpływ amidu kwasu nikotynowego na zmiany pobudliwości nerwu przedsionkowego i niektórych nerwów ruchowych w przewlekłym zatruciu dwusiarczkiem węgla u świnek morskich*, Med. Pracy, **12**, 355 (1961).
11. Konikova G. S., *Holesterin i fosfolipidi krovi pri dlitelnom vozdeistvii nekotorih promişlennih iadov-svinet, benzol i serouglerod*, Terapevticeskii Arhiv, **8**, 96 (1962).
12. Mezzasalma G., R. Cerbone, *Le alterazioni epatiche nell'intossicazione sperimentale da sulfuro di carbonio*, Folia med. (Neapole), **37**, 901 (1954).
13. Nofer J., J. Chojnowski, M. Kawecka, E. Kiec, T. Wronska-Szpakowa, Z. Wyszomirska, *Wpływ zawodowego narażenia na dwusiarczel węgla na powstawanie miażdżycy*, Med. Pracy, **12**, 101 (1961).
14. Paterni L., B. Pusic, S. Teodori, *Intossicazione lenta da CS_2 e arteriosclerosi da dieta ipercolesterolica del coniglio*, Folia med. (Neapole), **41**, 705 (1958).
15. Prerovska I., J. Srobová, *Vliv sirohliku na biochemické zmenu v séru u exponovanych lidi ve vztaku k aterokleroze*, Prakovny Lekarstvi, **15**, 25 (1963).
16. Rappaport F., F. Einhorn, *Sulfosalicylic acid as a substitute for paratoluene sulfonic acid*, Clin. chim. Acta, **161**, 5 (1960).
17. Ruikka I., *Postprandial serum turbidity in chronic carbon disulfide poisoning*, Ann. Med. intern. Fenn., **48**, Supl. 31, 1 (1959).
18. Simon K. H., *Chronische Vergiftung durch Schwefelkohlenstoff*, Med. Mschr., **16**, 810 (1962).
19. Szymczykiewicz K., *Wpływ witaminy B (tiaminy) na przebieg przewlekłego zatrucia CS_2 u białych szczurów*, Med. Pracy, **8**, 235 (1957).
20. Takagi K., T. R. Masuda, *Hirose Vitamin metabolism in relation to industrial poisoning*, J. sci. lab. (Japan), **29**, 647 (1953).
21. Velvart J., O. Ballog, *Vplyv sirouhlika na rozvoj aterosklerózy*, Prakovny Lekarstvi, **13**, 181 (1961).
22. Visconti E., *Rapporti tra alterazioni vascolari e modificazioni ematochimiche nel sulfocarbonismo clinico*, Folia med. (Neapole), **46**, 1 017 (1963).
23. Wronowa B., *Wlyw CS_2 na widalanie kwasu nikotynowego i tzw całkowitego kwasu nikotinowego u swinek morskich*, Med. Pracy, **12**, 125 (1961).
24. Wronska-Nofer T., B. Gluszek, *Badania akmywności lipolytyczne surowicy krwi i sciany aorty u szczurów zatruwanych dwusiarczkiem węgla*, Med. Pracy, **16**, 343 (1965).
25. Wronska-Nofer T., J. Nofer, J. Sokal, *Wydalanie metabolitów witaminy PP u ludzi narażonych na działanie dwusiarczku węgla*, Med. Pracy, **14**, 433 (1963).
26. Zahradnik R., *Bemerkungen zu den chemischen Unterlagen für Studium des Metabolismus des Schwefelkohlenstoffs*, Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., **16**, 184 (1958).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 247–255 (1967)

EVOLUȚIA CONȚINUTULUI DE AZOT TOTAL ȘI PROTEIC DIN STRUGURI ȘI DIFERITE POSIBILITĂȚI DE EXPRIMARE

P. IONESCU

616.1

Rezumat. — S-a urmărit evoluția azotului total și proteic la 6 soiuri de *Vitis vinifera*, în timpul creșterii, maturării și supramaturării strugurilor. Rezultatele s-au exprimat la o bacă și, procentual, la substanța proaspătă, substanța uscată și substanța uscată reziduală. Se stabilește comparativ dinamica azotului.
Comparînd diferitele moduri de exprimare a rezultatelor, se constată diferențe categorice în evoluția conținutului de azot total și proteic.

Conținutul de azot total, proteic și mineral din struguri a fost cercetat începînd cu primele momente care precedă pîrga strugurilor [1—4]. S-a constatat că cel mai ridicat conținut de azot total se găsește în pieliță, urmînd apoi, în ordine descrescîndă, semințele și pulpa [3], [5].

La maturitatea deplină a strugurilor, conținutul de azot din pulpa strugurelui este în general de două ori, iar uneori de pînă la cinci ori, mai mare decît în faza de pîrgă [4].

Azotul sub formă minerală este adus în bacă în mod continuu, însă concentrația sa scade totuși, deoarece în aceeași măsură este folosit în sinteza substanțelor azotate organice. În bacele verzi, azotul mineral reprezintă adesea jumătate pînă la patru cincimi din azotul total.

S-a mai constatat apoi că azotul aminic reprezintă, în bacele verzi, jumătate pînă la o treime din azotul organic, pentru ca la maturitatea deplină să nu mai reprezinte decît o pătrime pînă la o optime.

Urmărindu-se evoluția unor aminoacizi din struguri în timpul maturării [2], s-a constatat că are loc o acumulare; conținutul de prolină crește considerabil în zilele care precedă maturarea.

După conținutul de azot total, s-a făcut și o grupare a soiurilor [5]: soiuri bogate (Cabernet-Sauvignon, Sauvignon, Malbec) și soiuri sărace (St. Emillion, Merlot).

Dat fiind că în timpul creșterii și maturării bacelor componentele chimice ale sale au o evoluție foarte diferită — unele își măresc, altele își reduc conținutul — evoluția unei componente chimice este diferită după modul în care se face exprimarea. În această lucrare se prezintă conținutul strugurilor în azot total și proteic, în timpul creșterii, maturării și supramaturării bacelor, și modul în care ne apare evoluția lui, în funcție de felul în care exprimăm rezultatele.

MATERIAL ȘI METODĂ

În anul 1965, s-au folosit pentru experimentare strugurii soiurilor de vin St. Emillion, Sauvignon, Cabernet-Sauvignon și Merlot și ai soiurilor de masă Regina viilor și Lignan, din colecția de studii a Stațiunii experimentale viticole Drăgășani.

Tabela 1

Evoluția conținutului în azot total și azot proteic din struguri, exprimat la substanța uscată (în cursul anului 1965)

Soiul	29. VI	9. VII	19. VII	29. VII	9. VIII	19. VIII	29. VIII	9. IX	19. IX	29. IX	9. X
	Azot total (%)										
St. Emillion	1,930	1,815	1,458	1,442	1,303	1,241	0,873	0,680	0,680	0,542	0,596
Sauvignon	1,829	2,177	1,526	1,580	1,303	1,206	1,026	0,777	0,763	0,833	0,822
Cabernet-Sauvignon	2,018	1,864	1,720	1,649	1,594	1,456	0,610	0,735	0,472	0,701	0,763
Merlot	2,233	1,829	1,614	1,566	1,428	1,364	0,624	0,555	0,510	0,568	0,695
Regina viilor	1,993	1,871	1,428	1,097	0,735	0,626	0,513	0,610	0,721	0,749	0,755
Lignan	1,968	2,010	1,540	1,512	1,345	0,998	0,859	0,680	0,805	0,708	0,724
	Azot proteic (%)										
St. Emillion	1,428	1,331	0,968	0,818	1,068	0,947	0,845	0,624	0,541	0,433	0,453
Sauvignon	1,248	1,621	1,054	0,984	1,136	0,988	0,887	0,706	0,610	0,686	0,705
Cabernet-Sauvignon	1,463	1,331	1,289	1,026	1,303	1,068	0,545	0,680	0,403	0,582	0,687
Merlot	1,594	1,289	1,112	0,945	1,317	1,031	0,554	0,528	0,403	0,486	0,643
Regina viilor	1,470	1,194	0,847	0,709	0,624	0,515	0,485	0,486	0,472	0,568	0,581
Lignan	1,373	1,268	0,901	0,945	1,220	0,859	0,749	0,571	0,624	0,596	0,563
	Raportul azot total/azot proteic										
St. Emillion	1,35	1,36	1,47	1,76	1,21	1,31	1,03	1,09	1,25	1,25	1,21
Sauvignon	1,47	1,54	1,44	1,60	1,14	1,22	1,15	1,10	1,25	1,21	1,16
Cabernet-Sauvignon	1,37	1,39	1,33	1,60	1,22	1,36	1,11	1,08	1,17	1,20	1,11
Merlot	1,40	1,42	1,45	1,65	1,08	1,32	1,21	1,05	1,26	1,16	1,07
Regina viilor	1,35	1,56	1,68	1,54	1,17	1,21	1,05	1,25	1,52	1,31	1,30
Lignan	1,43	1,58	1,79	1,60	1,10	1,16	1,14	1,19	1,29	1,18	1,28

Plantaţia a avut vîrsta de 23 de ani şi toate soiurile studiate sînt altoite pe portaltoiul Riparia Gloria. Probele s-au recoltat în jurul orei 9, de la cîte 50 de butuci din fiecare soi, cît mai uniformi şi asemănători.

După recoltare, strugurii au fost spălaţi cu acid acetic 1% pentru îndepărtarea reziduurilor de sulfat de cupru aflate pe bace. Bacele s-au uscat în etuvă la 60° C, apoi au fost măcinate şi cernute printr-o sită cu ochiurile de 0,5 mm.

S-au determinat greutatea medie a 100 de bace, substanţa uscată, zahărul total, aciditatea totală, azotul total (după Kjeldahl) şi azotul proteic (după Barnstein).

Cantităţile de azot total şi proteic găsite s-au exprimat în patru moduri : procentual, la substanţa proaspătă, la substanţa uscată şi la substanţa uscată reziduală (= substanţa uscată minus conţinutul în zahăr total) [6] şi la o bacă. Valorile prezentate reprezintă media a două determinări paralele.

Primele determinări s-au efectuat la circa 6 zile după scuturarea florilor, atunci cînd ovarele fecundate au început să crească, diferenţiindu-se de cele nefecundate, iar după aceea din 10 în 10 zile, pînă la supramaturarea bacelor. Nu au existat diferenţe mari între soiuri cu privire la data scuturării florilor.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Evoluţia conţinutului de azot total şi proteic, raportat la o bacă, în timpul creşterii şi maturării strugurilor, rezultă din figurile 1—6. Se constată că conţinutul de azot total şi proteic al unei bace creşte paralel cu creşterea greutăţii acesteia. Datele obţinute de noi concordă în această privinţă cu cele din literatura de specialitate [1], [3—5]. Valori mari ale conţinutului de azot total şi proteic se înregistrează la soiul Sauvignon, urmat de soiurile Lignan, Cabernet-Sauvignon, Merlot, St. Emillion şi Regina viilor. În condiţiile podgoriei Drăgăşani, soiul Merlot pare să acumuleze o cantitate mai ridicată de azot total şi proteic decît cea indicată în literatură [5], situîndu-se la un nivel mediu.

La supramaturarea strugurilor, greutatea bacelor scade, dar conţinutul de azot total şi proteic scade moderat sau chiar creşte la majoritatea soiurilor. Numai la soiurile Sauvignon şi Lignan conţinutul de azot scade paralel cu diminuarea greutăţii bacelor. Această comportare poate fi datorată modificărilor conţinutului de zahăr al bacelor.

Din aceleaşi figuri se poate constata că ritmul de acumulare a azotului este diferit după soi. La soiurile Lignan şi Regina viilor, ritmul cel mai intens apare la aproximativ 35 de zile după scuturarea florilor, atunci cînd şi creşterea în greutate a bacelor are ritmul maxim, iar aciditatea începe să scadă, corespunzînd cu începutul fazei de pîrgă a strugurilor. La celelalte soiuri, această fază nu este atît de evidentă, acumularea de azot în bacă fiind treptată. Diferenţele de ritm în acumularea azotului pot fi datorate acumulării de zahăr, care depinde de precocitatea şi, respectiv, tardivitatea soiurilor. Acest fapt este evident la soiurile precoce (Regina viilor şi Lignan), care au un ritm de dezvoltare mai accelerat.

Un mers diferit al evoluţiei azotului total şi proteic, ca şi aspecte noi în posibilitatea de interpretare, rezultă din alte moduri de exprimare. Astfel, după cum se constată din tabela 1, unde valorile sînt raportate la substanţa uscată, conţinutul de azot total şi proteic scade treptat, cu viteze diferite în funcţie de soi, o dată cu creşterea şi maturarea acestora. Valoarea minimă se atinge la maturitatea deplină, iar la supramaturare

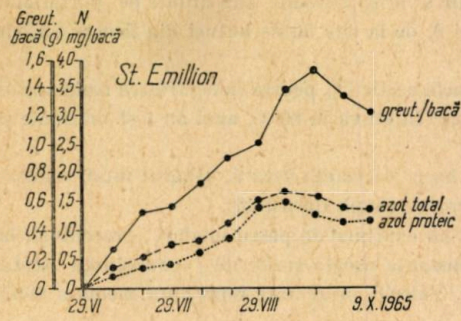


Fig. 1. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul St. Emillion în timpul vegetaţiei, în funcţie de greutatea bacelor.

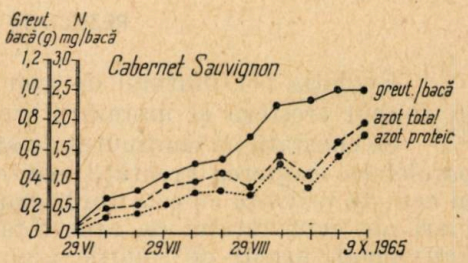


Fig. 2. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul Cabernet-Sauvignon în timpul vegetaţiei, în funcţie de greutatea bacelor.

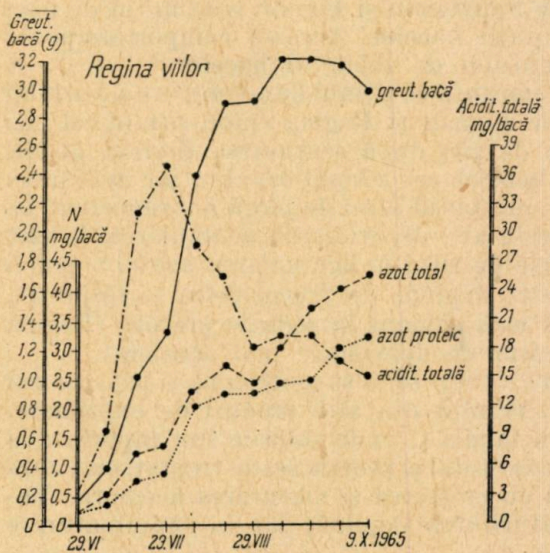


Fig. 3. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul Regina viilor în timpul vegetaţiei, în funcţie de greutatea bacelor.

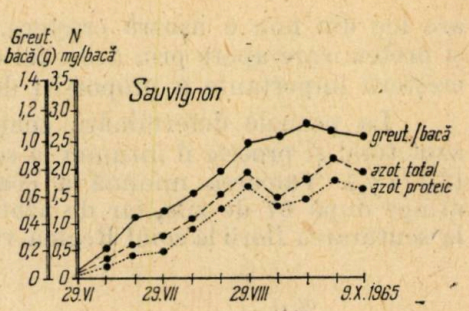


Fig. 4. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul Sauvignon în timpul vegetaţiei, în funcţie de greutatea bacelor.

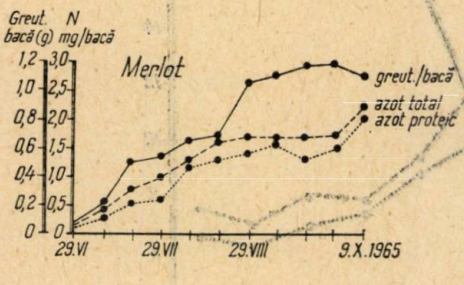


Fig. 5. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul Merlot în timpul vegetaţiei, în funcţie de greutatea bacelor.

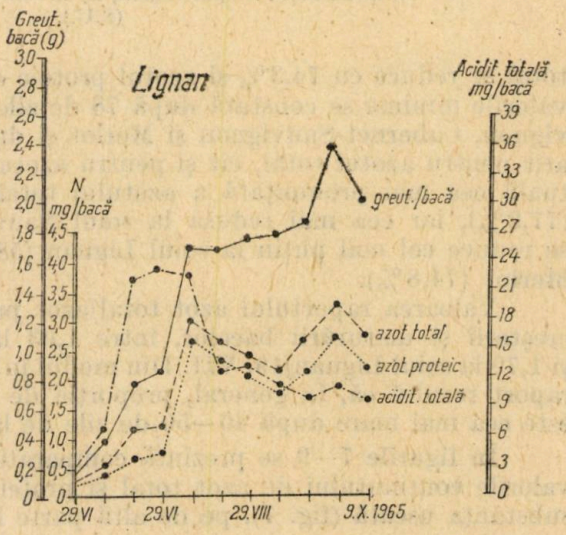


Fig. 6. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul Lignan în timpul vegetaţiei, în funcţie de greutatea bacelor.

are loc din nou o uşoară creştere. Scăderea conţinutului de azot total şi proteic care apare prin acest fel de exprimare este relativă şi datorată creşterii importante a proporţiei de zahăr în substanţa uscată.

La primele determinări, conţinutul procentual cel mai ridicat de azot total şi proteic îl întîlnim la soiurile Merlot (2,233%) şi Sauvignon (2,177%). Valoarea minimă a conţinutului de azot total (0,513%) se atinge după 67 de zile, iar de azot proteic (0,472%) după 88 de zile de la scuturarea florii la soiul Regina viilor. Faţă de conţinutul iniţial, azotul

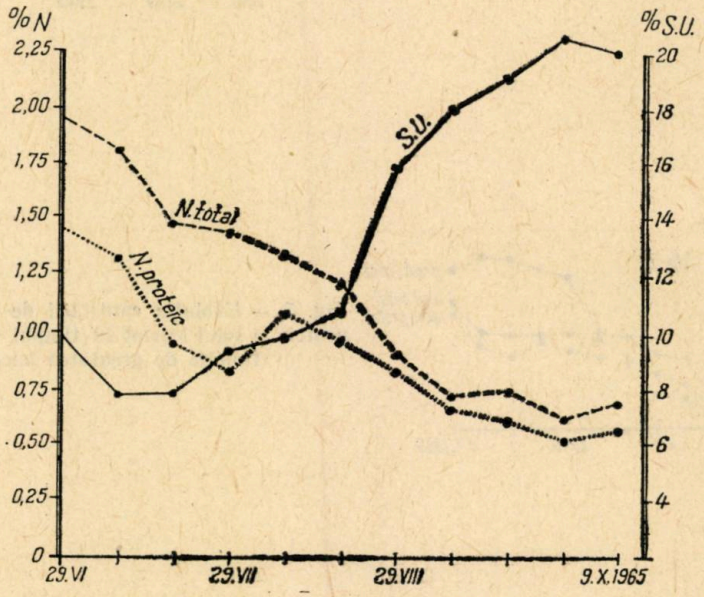


Fig. 7. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul St. Emillion în timpul vegetaţiei, în funcţie de substanţa uscată (S.U.).

total se reduce cu 74,3% şi azotul proteic cu 67,9%. La celelalte soiuri, valorile minime se constată după 78 de zile la Lignan, 88 de zile la Sauvignon, Cabernet-Sauvignon şi Merlot şi după 98 de zile la St. Emillion, atît pentru azotul total, cît şi pentru azotul proteic. Diminuarea procentuală cea mai pronunţată a azotului total se întîlneşte la soiul Merlot (77,2%), iar cea mai redusă la soiul Sauvignon (65%); azotul proteic se reduce cel mai puţin la soiul Lignan (58,5%) şi cel mai mult la soiul Merlot (74,8%).

Valoarea raportului azot total/azot proteic oscilează, în tot timpul creşterii şi maturării bacelor, între 1,03 la soiul St. Emillion/29. VIII şi 1,79 la soiul Lignan/19. VII. Din modul în care evoluează valorile acestui raport rezultă că, în general, proporţia de azot proteic din azotul total este cea mai mare după 40—50 de zile de la scuturarea florilor.

În figurile 7—9 se prezintă comparativ, pentru soiul St. Emillion, valorile conţinutului de azot total şi proteic raportat, pe de o parte, la substanţa uscată (fig. 7), pe de altă parte la substanţa uscată reziduală

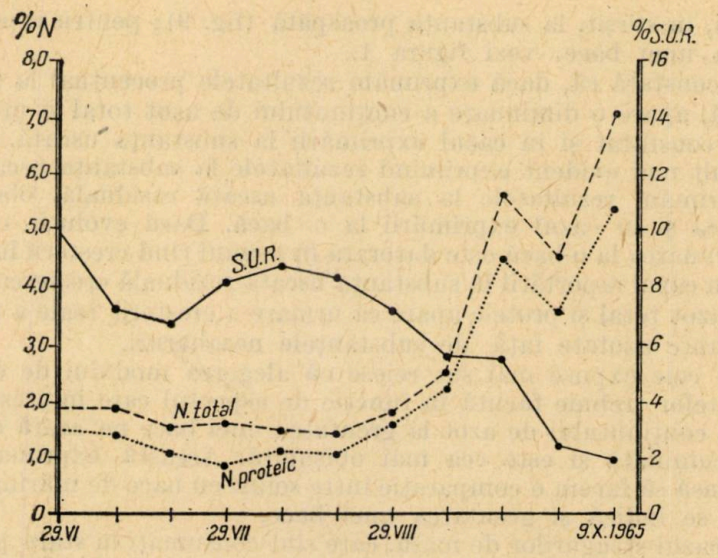


Fig. 8. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul St. Emillion în timpul vegetaţiei, în funcţie de substanţa uscată reziduală (S.U.R.).

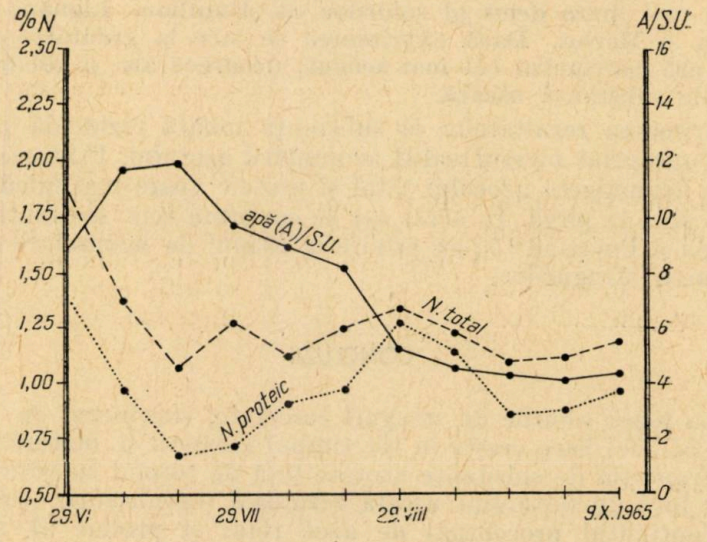


Fig. 9. — Evoluţia cantităţii de azot total şi proteic la soiul St. Emillion în timpul vegetaţiei, în funcţie de substanţa proaspătă (brută) (A/S.U.).

(fig. 8) şi, în sfîrşit, la substanţa proaspătă (fig. 9); pentru raportarea la greutatea unei bace, vezi figura 1.

Se constată că, dacă exprimăm rezultatele procentual la substanţa proaspătă, apare o diminuare a conţinutului de azot total şi proteic, aşa cum s-a constatat şi în cazul exprimării la substanţa uscată. Scăderea reiese mult mai evident exprimînd rezultatele la substanţa uscată. Dacă însă exprimăm rezultatele la substanţa uscată reziduală, observăm o creştere ca şi în cazul exprimării la o bacă. Dacă evoluţia constatată prin exprimarea la o bacă este datorată în primul rînd creşterii în greutate a bacei, în cazul raportării la substanţa uscată reziduală creşterea conţinutului de azot total şi proteic apare ca urmare a creşterii reale a proporţiei de substanţe azotate faţă de substanţele nezaharuri.

Din cele expuse mai sus reiese că alegerea modului de exprimare a rezultatelor trebuie făcută în funcţie de aspectul care interesează. Exprimarea conţinutului de azot la greutatea unei bace ne arată cantitatea totală acumulată şi este cea mai obişnuită. Această exprimare nu ne permite însă să facem o comparaţie între soiuri cu bace de mărimi diferite, dacă nu se indică şi greutatea unei bace.

În cazul strugurilor de masă, care sînt consumaţi în stare proaspătă, exprimarea adecvată a conţinutului lor de azot total şi proteic este cea procentuală la substanţa proaspătă.

Exprimarea procentuală la substanţa uscată este importantă în studiul fiziologic şi biochimic, deoarece arată modul de acumulare a unor componente ale substanţei uscate, comparativ cu altele. Ţinînd seama de felul în care s-au analizat bacele pentru această lucrare, valorile obţinute prin raportarea la substanţa uscată depind şi de proporţia de pieliţă şi sîmburi din bace la diferitele soiuri. Prin exprimarea la substanţa uscată, soiul Regina viilor are la maturitate un conţinut de azot total şi proteic mai mare decît al soiurilor St. Emillion, Lignan, Cabernet-Sauvignon şi Merlot. Dacă exprimarea se face la greutatea proaspătă, acest soi are conţinutul cel mai scăzut, deoarece are şi cel mai scăzut conţinut de substanţă uscată.

Exprimarea rezultatelor la substanţa uscată reziduală poate reda destul de apropriat mersul real al acumulării azotului. Prin acest mod de raportare, acumularea azotului total şi proteic apare mai mică şi relativ constantă pînă la pîrgă. În acest caz se confirmă cele susţinute de Ribereau-Gayon şi Peynaud [5] cu privire la ritmul de acumulare a azotului la maturarea strugurilor.

CONCLUZII

1. La toate soiurile de struguri cercetate, conţinutul de azot total şi proteic al unei bace creşte în tot timpul creşterii şi maturării.
2. Proporţia de substanţe azotate faţă de totalul substanţei uscate scade, iar faţă de substanţa uscată reziduală (nezaharuri) creşte.
3. Conţinutul procentual de azot total şi proteic al strugurilor proaspeţi scade.
4. Între evoluţia conţinutului de azot total şi de azot proteic există în general un paralelism. O proporţie mai mare de azot proteic faţă de

azotul total se înregistrează pînă la 40—50 de zile de la scuturarea florilor.

5. Evoluţia conţinutului de azot total şi proteic este mult diferită după modul de exprimare a rezultatelor. Alegerea acestuia trebuie făcută în funcţie de aspectele care interesează.

Prezentată la redacţie
la 24 martie 1966

Staţiunea experimentală viticolă
Drăgăşani

BIBLIOGRAFIE

1. Laborde J., G. Despagne, *Contribution à l'étude des variations de l'azote dans le jus de raisin pendant le développement de la grappe*, Rev. de Vitic., **13**, 89 (1900).
2. Lafon-Lafourcade S., G. Guimberteau, *Évolution des aminoacides au cours de la maturation des raisins*, Vitis, **3**, 130—135 (1962).
3. Peynaud E., A. Maurié, *Sur l'évolution de l'azote dans les différentes parties du raisin au cours de la maturation*, Ann. Technol agric., **2**, 15 (1953).
4. Peynaud E., *Sur les variations de l'azote du raisin au cours de la maturation*, Rev. de Vitic., **90**, 189 şi 213 (1939).
5. Ribereau-Gayon J., E. Peynaud, *Traité d'œnologie*, vol. I, Paris, 1960, p. 62 şi 110.
6. Zaprometova M. N., *Biohimiceskie metodi analiza rastenii*, Izd. Inostr. Lit., Moscova, 1960, p. 14.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 257–265 (1967)

CROMATOGRAFIA AMINOACIZILOR DIN LICHIDUL FOLICULAR ŞI SERUL SANGUIN DE SUIDEE

ALICE KAPRI

612.398.192

Rezumat. — Aminoacizii liberi şi cei obţinuţi prin hidroliza proteinelor lichidului folicular şi a serului sanguin de suidee au fost separaţi prin metoda cromatografiei pe hîrtie şi apoi determinaţi cantitativ.

Rezultatele obţinute arată în general un conţinut mai mare de aminoacizi liberi în lichidul folicular decît în serul sanguin. Fac excepţie însă grupele : fenil-alanină-leucină-triptofan şi valină-metionină, a căror concentraţie este cu mult mai ridicată în serul sanguin decît în lichidul folicular.

Cromatogramele hidrolizatelor proteice prezintă o analogie în ceea ce priveşte tipurile de aminoacizi constituenţi ai proteinelor lichidului folicular şi serului sanguin, dar arată în acelaşi timp o distribuire cantitativă diferită a acestora.

Interpretarea rezultatelor obţinute pledează pentru existenţa unui proces de biosinteză proteică la nivelul ovarului şi pentru utilizarea leucinei şi valinei în procesul de geneză a hormonilor ovarieni.

Cercetările noastre cu privire la compoziţia şi analogia lichidului folicular cu serul sanguin ne-au arătat că cel dintîi este în mare parte constituit pe baza substanţelor organice şi anorganice difuzate din plasma sanguină [1], [2], [6].

Prezenţa în lichidul folicular a unor substanţe cu structură macromoleculară, ce nu pot pătrunde în celulă prin simplă difuziune, ca şi variaţiile cantitative pe care aceşti compuşi le prezintă faţă de serul sanguin, indică existenţa unui proces de elaborare la nivelul foliculilor ovarieni.

Studiul electroforetic al proteinelor şi cenapselor lipo- şi glicoproteice din lichidul folicular şi serul sanguin ne-a confirmat în parte ipoteza făcută, întrucît există diferenţe nete în distribuţia şi conţinutul procentual al unor fracţiuni proteice, în special al lipoproteinelor *.

Referindu-ne la substanţele proteice, ne-am propus să verificăm presupunerea făcută cu privire la elaborarea acestora la nivelul celulelor foliculare, prin studiul cromatografic al aminoacizilor liberi şi al celor obţinuţi prin hidroliza proteinelor lichidului folicular şi ale serului sanguin.

---

* Date personale.

MATERIAL ŞI METODĂ

Determinările s-au făcut pe lichidul folicular şi serul sanguin recoltat de la 100 de scroafe, grupate în 10 loturi. Materialul proaspăt a fost recoltat de la abator şi analizat imediat.

Lichidul folicular şi serul sanguin se centrifughează timp de 10 minute de 3 000 *g*, se deproteinizează, se delipidează şi se desalifiază.

Deproteinizarea s-a făcut după tehnica Awapara [4]. La filtratul obţinut se adaugă 5 ml apă distilată şi 100 ml cloroform ; se agită puternic 5 minute, apoi se lasă să se separe 5—6 ore. După separare, stratul apos se diluează cu apă distilată pînă la un volum final de 20—25 ml, apoi se trece printr-o coloană cu Dowex 50, forma H^+, 200/400 mesh. În continuare, pentru desalifierea probelor şi eluarea aminoacizilor de pe colană s-a folosit tehnica Mueller şi colab. [6].

Eluatele ce conţin aminoacizii se reunesc şi se evaporă la sec, pe baie de apă, la 60°C.

Pentru obţinerea aminoacizilor ce intră în compoziţia proteinelor lichidului folicular şi serului sanguin s-a folosit hidroliza acidă. Serul şi lichidul folicular tratate cu acid clorhidric 6 N în proporţia 1 : 3 se menţin pe baie de apă, la 100°C, într-un balon cu refrigerent ascendent, timp de 12 ore. Hidrolizatul se filtrează, se neutralizează şi se desalifiază prin tehnica folosită şi în cazul aminoacizilor liberi.

Pentru cromatografiere s-a folosit sistemul bidimensional. Probele s-au aplicat pe hîrtie S. S. 2043 a, în spoturi de 80 µl pentru aminoacizii liberi şi de 10 µl pentru aminoacizii hidrolizaţi.

Developarea s-a făcut în sistemele :

1) alcool butilic normal, acid acetic, apă (4 : 1 : 5) ;

2) fenol saturat cu apă.

În primul sistem, irigarea se repetă de două ori în aceeaşi direcţie, apoi o dată în sens perpendicular în sistemul al doilea, aceasta permiţînd o separare mai eficientă a grupelor de aminoacizi cu Rf-uri apropiate. După fiecare irigare, cromatogramele se usucă la temperatura camerei. După ultima uscare, pentru a îndepărta urmele de solvenţi, cromatogramele se ţin cîteva minute în etuvă, la 60°C, apoi se pulverizează cu o soluţie butanolică de ninhidrină 0,2% şi se ţin 10 minute din nou în etuvă, la 60—70°C.

Evaluarea cantitativă se face prin metoda colorimetrică. Din cromatograme se decupează petele ce conţin aminoacizii, se fragmentează şi se pun în eprubete cu dop rodat. În fiecare eprubetă se adaugă cîte 5 ml soluţie acetonică de clorură de cadmiu [4], se lasă în repaus 15 minute, după care extincţiile se citesc la spectrofotometru, pe 530 mµ. Deoarece extincţia molară diferă în funcţie de aminoacid, concentraţiile diferiţilor aminoacizi s-au stabilit prin interpolare cu extincţiile obţinute pentru un amestec de aminoacizi martori, prelucraţi similar şi simultan cu probele de analizat.

REZULTATE

Tabelele 1 şi 2 cuprind rezultatele determinărilor cantitative, exprimate în miligrame la 100 ml de lichid folicular şi ser sanguin.

Pe cromatogramele prelucrate în vederea determinării aminoacizilor liberi s-au pus în evidenţă : acidul glutamic, serina, glicina, histidina, alanina şi grupele fenil-alanină-leucină-triptofan şi valină-metionină.

Rezultatele obţinute pentru aminoacizii liberi arată că acidul glutamic, serina, glicina, histidina şi grupul fenil-alanină-leucină-triptofan se găsesc constant în toate loturile, atît în lichidul folicular, cît şi în serul

Tabela 1

Aminoacizii liberi din lichidul folicular și din serul sanguin de suidee (mg/100ml)

Nr. lot.	Acid glutamic	Serină	Glicină	Histidină	Cistină	Acid aspartic	Arginină	Alanină	Fenil-alanină-leucină triptofan	Tirozină	Valină metionină	Cisteină	Lizină
						lichidul folicular							
1	7,6	2,75	4,37	5,87	14,25	—	—	4,06	1,62	—	4,02	—	—
2	9,5	1,62	2,62	5,87	19,00	—	—	5,37	6,75	—	—	—	—
3	—	1,08	2,91	2,33	3,16	—	7,60	2,66	2,16	—	6,33	—	—
4	1,90	1,08	—	2,37	3,11	—	—	0,90	1,08	—	—	9,5	—
5	6,12	—	1,62	2,66	—	—	—	2,71	urme	—	urme	—	—
6	5,33	7,75	7,75	8,76	—		—	7,87	7,10	—	—	—	—
7	6,20	1,02	9,00	5,63	12,30	—	—	6,00	5,25	—	—	—	—
8	4,76	2,00	2,52	3,40	—	—	—	4,20	2,70	—	—	—	—
9	5,66	3,25	4,72	4,46	2,02	—	—	4,20	2,16	—	—	—	—
10	4,90	1,60	3,30	5,09	13,00	—	—	1,68	3,12	—	—	—	—
MEDII	5,23	2,31	3,28	4,54	6,68	—	—	3,95	3,19	—	1,035	—	—
						serul sanguin							
1	2,85	2,75	3,37	4,75	9,60	—	—	2,15	1,62	—	1,30	—	—
2	3,80	1,08	1,75	3,75	19,00	—	—	4,06	9,25	19,0	6,65	—	—
3	3,16	0,83	1,00	1,60	—	—	2,87	1,36	2,56	—	4,57	—	—
4	0,60	1,83	2,33	4,75	—	—	5,50	0,90	1,56	—	12,60	—	—
5	6,12	—	2,00	2,66	—	—	—	3,38	—	—	—	—	—
6	2,66	5,50	2,75	3,25	—	—	—	6,25	14,25	—	—	—	—
7	3,15	2,08	0,97	1,60	8,30	—	—	1,12	7,10	—	3,29	—	—
8	2,60	2,20	2,39	4,70	—	—	—	2,32	3,30	—	7,50	—	—
9	2,20	3,07	4,20	2,66	—	—	—	5,40	4,27	—	—	—	—
10	4,00	2,00	1,60	3,40	2,20	—	—	3,38	3,12	—	—	—	—
MEDII	3,11	2,03	2,23	3,31	3,90	—	—	3,03	4,70	—	3,29	—	—

Tabela 2

Aminoacizii obținuti prin hidroliza acidă a proteinelor licaidului folicular și a serului sanguin de suidee (mg/100 ml)

Nr. lot.	Acid glutamic	Serină	Glicină	Histidină	Cistină	Acid aspartic	Arginină	Alanină	Fenila-alanină-leucină	Tirozină	Valină-metioninâ	Cisteină	Lizină	Treonină
						lichidul folicular								
1	185,200	107,50	140,30	145,50	—	199,5	—	245,1	361	35,6	92,60	—	—	92,60
2	17,8	138,85	96,00	—	37,50	399,0	—	296,4	38,0	57,00	114,00	—	—	112,60
3	156	50,60	26,00	139,00	—	57	237,40	342	247,00	40,20	114,00	—	—	262,2
4	213	93	401,18	101,30	139,00	57	250,80	433,2	278,00	42,70	708,50	—	—	193,80
5	185,20	228	—	228,50	—	95	270,00	319,20	361,00	14,00	71,20	—	—	68,4
6	107	—	—	221,00		—	—	193,80	340,20	85,5	413,00	—	—	—
7	292	202,75	166,50	449,50	44,3	570	28,300	433,20	725,00	99,5	273,60	—	—	248,60
8	139	103,40	89,50	333,00	—	—	—	300,01	296,20	48,30	283,00	—	—	173,00
9	207,05	96,00	140,00	201,50	120,3	230,8	270,50	279,00	203,00	33,70	109,30	—	—	—
10	193,20	143,00	160,00	183,20	—	143,5	—	362,00	380,93	29,70	202,50	—	—	93
MEDII	185,26	116,31	121,48	200,25	34,11	175,18	131,17	330,48	357,28	48,60	188,47	—	—	123,42
						serul sanguin								
1	320,50	183,50	92,00	50,26	—	161,50	—	78,80	273,50	94,75	178,0	—	—	142,5
2	142,0	177,00	74,50	246,50	95,00	480,00	421,80	376,00	520,0	78,00	235,10	—	—	210,6
3	382,50	63,25	55,00	395,00	78,75	66,25	142,50	456,00	285,00	70,00	142,50	—	—	276,75
4	280,00	50,60	333,00	228,00	38,00	57,00	—	444,60	570,00	42,70	156,70	—	—	—
5	121,10	240,60	—	240,60	25,00	285,00	270,00	342,00	551,00	28,00	104,00	—	—	114,00
6	156,00	—	—	304,00	—	—	—	330,60	402,30	216,0	513,00	—	—	—
7	320,00	310,5	165,5	405,30	44,3	5,60	228,00	467,40	589,00	121,00	307,80	—	—	331,75
8	152,00	225,00	183,00	225,00	38,00	330,00	216,30	265,40	324,00	83,00	169,0	—	—	153,70
9	293,00	179,50	102,50	370,50	41,00	279,00	—	409,10	299,60	49,00	203,60	—	—	196,00
10	180,00	203,00	79,00	269,00	20,00	400,00	173,00	394,85	542,00	111,00	344,00	—	—	221,00
MEDII	234,71	163,29	107,45	283,35	38,00	261,97	145,16	366,47	477,61	89,24	235,37	—	—	174,63

sanguin (fig. 1 și 2). Ceilalți aminoacizi prezintă unele particularități. Cistina, de exemplu, apare aproape în toate cromatogramele lichidului folicular, în timp ce în serul sanguin de cele mai multe ori lipsește. Grupul valină-metionină, care în condițiile metodei de cercetare folosite migrează într-un spot comun, se comportă diferit, în sensul că apare mai frecvent

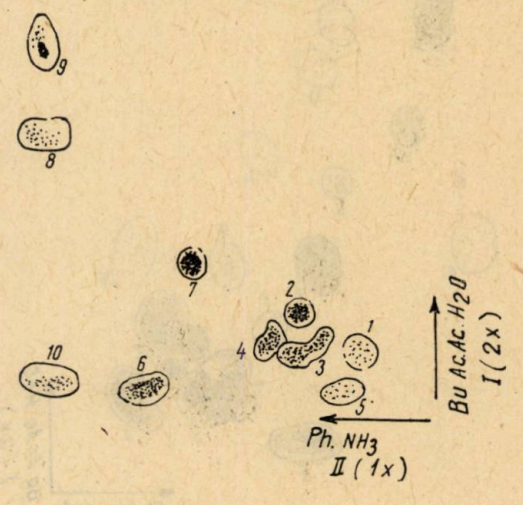


Fig. 1. — Aminoacizii liberi din lichidul folicular de suidee.

1 — acid aspartic; *2* — acid glutamic; *3* — serină; *4* — glicină; *5* — cistină; *6* — histidină; *7* — alanină; *8* — valină-metionină; *9* — leucină-triptofan-fenil-alanină; *10* — lizină.

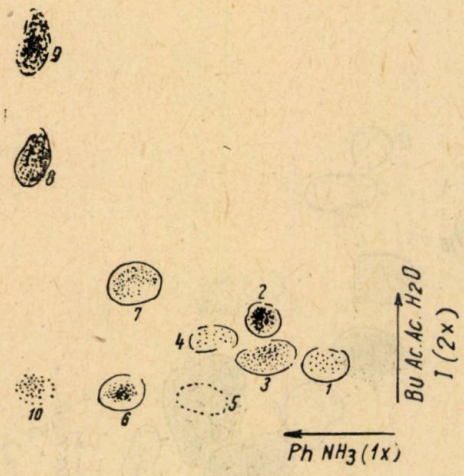


Fig. 2. — Aminoacizii liberi din serul sanguin de suidee.

1 — acid aspartic; *2* — acid glutamic; *3* — serină; *4* — glicină; *5* — cistină; *6* — histidină; *7* — alanină; *8* — valină-metionină; *9* — leucină-triptofan-fenil-alanină; *10* — lizină.

în serul sanguin decît în lichidul folicular. Astfel, în serul sanguin acest grup de aminoacizi a fost pus în evidență la 6 loturi de animale, pe cînd în lichidul folicular numai la 3.

Cu totul sporadic au apărut pe cromatograme cisteina, tirozina și arginina.

Concentrația aminoacizilor liberi variază foarte mult. De exemplu, acidul glutamic, în cele 10 cazuri în care s-a dozat, a variat între 9,5 și 1,90 mg% în ser, iar în lichidul folicular între 6,12 și 0,60 mg%. Histidina a variat de la 8,76 la 2,39 mg% în ser, iar în lichidul folicular de la 7,75 la 1,6 mg%. În general însă, lichidul folicular este mai bogat în aminoacizi

liberi decît serul sanguin. De exemplu, la primul lot acidul glutamic s-a găsit în lichidul folicular în concentrație de 9,5 mg%, iar în serul corespunzător în concentrație de 3,80 mg%; lichidul folicular conține 8,76 mg%

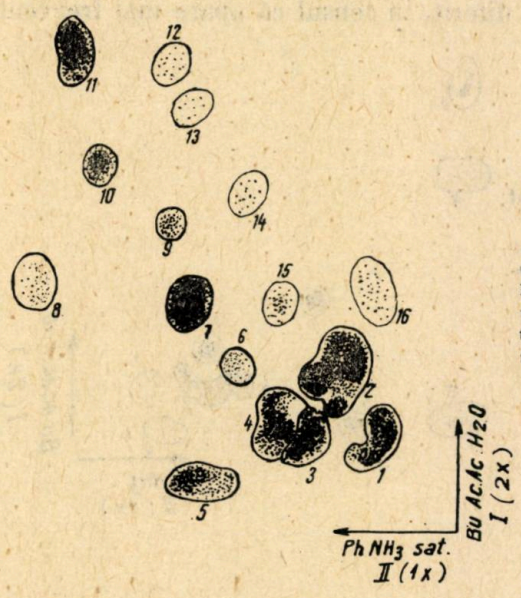


Fig. 3. — Aminoacizii din lichid folicular hidrolizat de suidee.

1 — acid aspartic; *2* — acid glutamic; *3* — serină; *4* — glicină; *5* — histidină; *6* — treonină; *7* — alanină; *8* — prolină; *9* — tirozină; *10* — valină-metionină; *11* — leucină-fenil-alanină; *12* — *2,3*-diiod-tirozină (?); *13* — *3*-iod-tirozină (?); *14* — *3*-brom-tirozină (?); *15* — acid metilen-glutamic sau acid *gamma*-metil-glutamic (?); *16* — dibrom-tirozină.

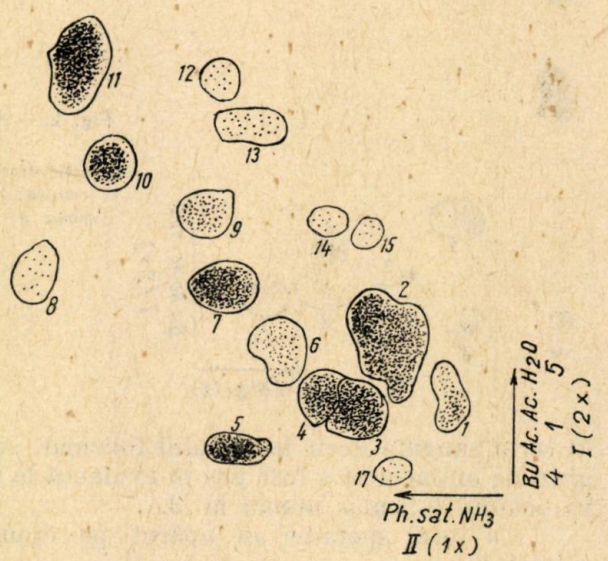


Fig. 4. — Aminoacizii din ser hidrolizat de suidee.

1 — acid aspartic; *2* — acid glutamic; *3* — serină; *4* — glicină; *5* — histidină; *6* — treonină; *7* — alanină; *8* — prolină; *9* — tirozină; *10* — valină-metionină; *11* — fenil-alanin-leucină; *12* — *2, 3*-diiod-tirozină (?); *13* — *3*-iod-tirozină (?); *14* — *3*-brom-tirozină (?); *15* — dibrom-tirozină (?).

histidină, iar serul 3,25 mg%. Analog se prezintă și ceilalți aminoacizi dozați, cu excepția grupelor fenil-alanină-leucină-triptofan și valină-metionină, a căror concentrație este de obicei mai mică în lichidul folicular.

Examinînd valorile medii pentru diferiţii aminoacizi liberi, se remarcă o acumulare de cistină la lichidul folicular şi de fenil-alanină-leucină-triptofan şi valină-metionină în serul sanguin.

Cromatogramele hidrolizatelor proteinice ale lichidului folicular şi serului sanguin prezintă un număr mai mare de aminoacizi (fig. 3 şi 4): acid glutamic, serină, glicină, histidină, acid aspartic, arginină, alanină, fenil-alanină-leucină, tirozină, valină-metionină, treonină, prolină şi derivaţi de tirozină şi acid glutamic: *2,3*-diiod-tirozină-dibrom-tirozină, *3*-iod-tirozină, *3*-brom-tirozină, brom-tirozină, acid *gamma*-metilen-glutamic şi acid *gamma*-metil-glutamic. Întrucît nu am avut la dispoziţie derivaţii autentici de tirozină şi acid glutamic, identificarea s-a făcut pe baza hărţilor existente [8]. Dozarea lor, ca şi a prolinei, nu s-a făcut. De altfel, cu excepţia prolinei, ceilalţi derivaţi de aminoacizi nu au apărut pe toate cromatogramele.

Din punctul de vedere al tipurilor de aminoacizi din proteine, între lichidul folicular şi serul sanguin există o analogie mai evidentă decît în cazul aminoacizilor liberi, căci atît în compoziţia proteinelor lichidului folicular, cît şi în aceea a proteinelor serice intră aceiaşi aminoacizi. Dozarea lor arată însă o distribuţie cantitativă diferită. Evident, proteinele serice au un conţinut mai bogat în aminoacizi decît proteinele lichidului folicular.

Şi în cazul aminoacizilor obţinuţi prin hidroliză se observă o mare diferenţă cantitativă de la lot la lot, păstrîndu-se însă în general raportul de concentraţie al acestora în ser şi lichidul folicular. Valorile medii procentuale stabilite pentru aminoacizii din hidrolizate arată un conţinut crescut al acestora în serul sanguin.

DISCUŢII

Sursa aminoacizilor în organism, în afara slabelor posibilităţi de biosinteză, o constituie degradarea enzimatică a aportului alimentar şi a proteinelor tisulare. Existenţa în lichidul folicular a unor aminoacizi esenţiali, ca: fenil-alanină-leucină-triptofan, valină-metionină şi cistină, ne determină să acceptăm originea lor plasmatică. Pe de altă parte însă, conţinutul mai ridicat al unor aminoacizi în lichidul folicular arată că la acest nivel nu are loc numai un proces de difuzare. Concentraţia acestor aminoacizi se poate datora în aceeaşi măsură atît posibilităţilor de sinteză la acest nivel, cît şi proceselor de degradare a proteinelor.

Deoarece celula are capacitatea de a concentra diferiţii aminoacizi şi a stabili un anumit raport între ei în vederea sintezei proprii, presupunem că variaţiile cantitative ale aminoacizilor liberi din lichidul folicular sînt expresia procesului de biosinteză proteică ce are loc la nivelul celulelor tecii interne şi granuloasei.

Lipsa valinei şi metioninei în lichidul folicular la majoritatea loturilor de animale, ca şi concentraţia scăzută a grupei de aminoacizi fenil-alanină-leucină-triptofan, îşi găseşte explicaţia în posibilitatea de metabolizare a acestor aminoacizi.

Degradarea enzimatică a leucinei conduce la formarea acidului *beta*-hidroxil-metil-glutamic (HMG). Acesta este transformat în acid

mevalonic, printr-un proces reductiv ce are loc sub influența unei reductaze. Aceasta necesită ca donator de hidrogen prezența $NADPH_2$. Acidul mevalonic, sub influența ATP ca donator de grupare fosfat și în prezența NADP, NAD și ionilor de magneziu, formează o serie de compuși fosfatici intermediari care conduc la formarea scualenului. Scualenul apoi, prin ciclizare, trece în colesterol. Această metabolizare a leucinei, deși nu obișnuită, este importantă, deoarece stabilește o corelație între aminoacizii liberi și formarea colesterolului, demonstrat ca precursor al hormonilor estrogeni. Concentrația scăzută a grupului de aminoacizi fenil-alanină-leucină-triptofan, găsită de noi în lichidul folicular, întărește datele semnalate în literatură [9] cu privire la rolul acestora în procesul de hormonogeneză ovariană. Valorile foarte diferite ce revin grupului valină-metionină în lichidul folicular și în serul sanguin demonstrează consumul de leucină la acest nivel, deoarece se știe că valina este implicată în procesul de biosinteză a leucinei.

Acumularea cistinei în lichidul folicular este și ea legată, desigur, de activitatea intensă metabolică de la nivelul ovarului, întrucît sistemul oxidoreductor cistină-cisteină participă la multe procese biologice. De amintit numai că transformarea HMG în acid mevalonic necesită prezența cisteinei și glutationului [1]. Oxidarea spontană a cisteinei în cistină în prezența aerului ar putea să explice lipsa cisteinei pe cromatogramă.

În urma studiului electroforetic al proteinelor și cenapselor lipo- și glicoproteice, făcut de noi[2], am constatat o analogie între serul sanguin și lichidul folicular numai în ceea ce privește cenapsele glicoproteice. În ceea ce privește în special lipoproteinele și unele globuline, am găsit diferențe relativ mari. Dacă pentru fracțiunile proteice nu se semnalează decît diferențe cantitative, mai mult sau mai puțin apreciabile, pentru cenapsele lipoproteice există diferențe mari. Compoziția în aminoacizi a hidrolizatelor proteice ale lichidului folicular și serului sanguin arată o asemănare numai în ceea ce privește tipurile de aminoacizi ce intră în compoziția proteinelor, cantitativ existînd însă diferențe destul de mari. Din rezultatele obținute pentru aminoacizii din hidrolizate se poate afirma că în constituția proteinelor lichidului folicular și ale serului sanguin intră aceiași aminoacizi, dar distribuția lor cantitativă este diferită. Privitor la natura substanțelor proteice din lichidul folicular există diferite păreri. După unii autori (3), proteinele lichidului folicular sînt de natură plasmatică, acest lichid fiind în totalitate considerat ca un transudat sanguin. Alți autori [7] afirmă că proteinele sînt sintetizate la nivelul tecii interne, iar lichidul folicular este rezultatul activității secretorii a celulelor acestei teci [5]. Legat de rezultatele obținute atît prin metoda electroforetică, cît și prin cromatografia aminoacizilor liberi și a celor din hidrolizate, putem afirma că, cel puțin în ceea ce privește substanțele proteice, acestea sînt rezultatul proceselor de biosinteză ce au loc la nivelul tecilor foliculilor ovarieni.

Cercetările histochimice ale lui Pellejero Altuna [7] indică ca loc de formare pentru substanțele proteice teaca internă, iar pentru biosinteza hidraților de carbon celulele granuloasei. Cercetările noastre nu au

[1] M. Vanghelovici, comunicare la cea de-a V-a Sesiune a I.M.F., Timișoara.
[2] Date nepublicate.

permis localizarea acestor procese, ele au urmărit să elucideze numai problema naturii substanţelor proteice din lichidul folicular. Credem că putem afirma că, dacă unele substanţe prezente în lichidul folicular sînt de natură plasmatică, substanţele proteice, în marea lor majoritate, sînt rezultatul activităţii tecilor foliculului, iar variaţiile cantitative ale unora din aminoacizii liberi s-ar datora, pe de o parte, necesităţilor impuse de procesul de hormonogeneză, iar pe de altă parte biosintezei proteinelor proprii.

Prezentată la redacţie
la 30 mai 1966

Laboratorul de Histologie
I.M.F., Iaşi

BIBLIOGRAFIE

1. Araţei H., Mironeanu T., *Cîteva date chimice şi fizico-chimice asupra lichidului folicular la suidee*, St. cerc. şt. med., Acad. R.P.R., fil. Iaşi, **1**, 101 (1962).
2. Araţei H., Olaru D., *Determinarea elementelor anorganice din lichidul folicular, membrana foliculară şi serul sanguin la suidee cu ajutorul spectroscopiei de emisie*, St. cerc. şt. med., Acad. R.P.R., fil. Iaşi, **2**, 384 (1962).
3. Caravaglios R., Cilotti R., *A study of the proteins in the follicular fluid of the cow*, J. Endocrin., **15**, 273 (1957).
4. Hais M. I., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1960.
5. Kapri A., Araţei H., *Biochimia lichidului folicular*, St. cerc. biochim., Acad. R.P.R., **3**, 319 (1965).
6. Mueller G. C., Bowman G., Ailen H., *Desalting aminoacids solutions by ion exchange*, Anal. chem., **27**, 1357 (1955).
7. Pellejero Altuna S., *Histochemistry and biochemistry of the Groofian follicle in man and other mamals*, Excerpta med., **4**, 880 (1960).
8. Smith I., *Chromatography and electrophoretic technique*, vol. II, Williams Heinemann, Londra, 1960.
9. Soru E., *Biochimie medicală*, Edit. medicală, Bucureşti, 1963.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 267–272 (1967)

DETERMINAREA UREEI SANGUINE PRIN METODA ENZIMATICĂ CU UREAZĂ

OLIMPIA MAMULEA şi FLORICA TOCILESCU

612.398.12

Rezumat. — Dozarea ureei sanguine prin metoda enzimatică propusă (macro şi micro) se bazează pe complexul format de reactivul Nessler şi NH_4^+ rezultat din descompunerea ureei de către urează.

În condiţiile stabilite ale metodei, legea lui Lambert-Beer se respectă cel puţin pînă la 250 mg uree pentru macrometodă şi 220 mg/100 ml pentru micrometodă.

Dintre metodele de determinare cantitativă a ureei, metoda gravimetrică cu xanthidrol şi metoda cu urează dau rezultatele cele mai specifice.

Faptul că ureaza nu acţionează asupra nici unui component azotat, în afară de uree, nici chiar asupra manometil-ureei, demonstrează specificitatea sa ridicată [1].

Raportînd rezultatele obţinute cu urează pe plasmă la cele obţinute pe sînge total, Beer a pus în evidenţă o valoare crescută a ureei din sîngele total, pe care o atribuie unei arginaze intrahematice, cu acţiune specifică asupra argininei din soia [1]. Cantitatea de uree rezultată din descompunerea argininei se cumulează la rezultatul final, astfel încît valorile ureei obţinute pe sînge total sînt mai ridicate decît cele obţinute pe ser sau plasmă.

Cu toate că metoda cu xanthidrol şi metoda cu urează dau rezultatele cele mai precise, în laboratorul clinic se utilizează metoda Kowarsky, bazată pe descompunerea ureei cu hipobromit. În condiţiile uzuale de lucru, cantitatea de N_2 dezvoltată nu reprezintă 100% din N_2 calculat teoretic. Eroarea negativă datorită reacţiei incomplete nu se adiţionează erorii pozitive datorite N_2 rezidual, astfel încît cantitatea finală de uree poate fi mai mare sau mai mică decît cea teoretică [1].

În laboratoarele clinice cu specific urologic, unde numărul analizelor zilnice de uree este mare, metoda Kowarsky însumează la inconvenientele citate timpul îndelungat necesar dozărilor, precum şi eroarea datorită corecţiei de temperatură şi presiune [5].

Dată fiind, pe de o parte, nespecificitatea metodei cu hipobromit, iar pe de alta toxicitatea ridicată a bromului folosit la prepararea hipobromitului, propunem o nouă metodă (macro şi micro) de determinare a ureei sanguine, bazată pe acţiunea ureazei extrase extemporaneu din seminţe de soia fin măcinate.

MATERIAL ȘI METODĂ

Pe un număr de 400 de seruri s-au făcut determinări de uree prin metoda Kowarsky, paralel cu noua metodă propusă. Dintre ele, 157 au servit la determinări duble, cu macro- și micrometoda.

Reactivi

1. Soluția NaCl 9‰ în tampon Sörensen pH 7:

$HNa_2PO_4 \cdot 2H_2O$	7,125 g
H_2KPO_4 anhidru	3,515 g
NaCl	9 g
H_2O	*aq.* 1 000 ml

2. Acid tricloracetic ~ 10%

3. Reactiv Nessler: se dizolvă 11,5 g iod într-o soluție de IK (15 g IK + 10 ml H_2O). Se păstrează 1 ml din această soluție, iar în rest se adaugă 15 g Hg metalic. Se agită răcind din cînd în cînd, pînă soluția devine galbenă-verzie. Se încearcă cu o soluție de amidon 1% dacă se obține o coloratie slab verzuie. În caz negativ se adaugă puțin din soluția de iod păstrată. Se decantează imediat și apoi se filtrează într-un balon cotat de 100 ml, completîndu-se cu apă la semn. La această soluție se adaugă 487,5 ml NaOH 10% [1].

4. Extract de soia. Peste 1 ml soluție de NaCl tamponată se adaugă într-o eprubetă gradată de 10 ml, cu dop, 1 g făină de soia fin măcinată și se omogenizează, aducîndu-se apoi la semn cu soluție tampon. Se agită bine și se lasă 15 min, se centrifughează și se decantează supernatantul.

Extractul de soia astfel preparat este capabil să descompună, în condițiile propuse, o soluție 1% de uree. Este necesară controlarea activității enzimatice a fiecărei șarje de soia; dacă activitatea este mai scăzută, se va mări cantitatea cîntărită de făină de soia pentru 10 ml.

5. Soluția etalon de uree, 100 mg la 100 ml.

TEHNICA DE LUCRU PENTRU MACROMETODĂ

Într-o eprubetă de 20 ml se adaugă 1 ml ser sau plasmă peste 4 ml soluție NaCl tamponată (reactivul *1*) și 0,5 ml extract de soia.

După 15 minute de incubare la temperatura laboratorului (20—25°C) se introduc 2 ml soluție de acid tricloracetic (reactivul *2*) și se agită puternic, pentru deproteinizare totală. Serul deproteinizat se filtrează sau se centrifughează 10 min la 3 000 ture/min. Din supernatantul clar se iau 0,2 ml și se introduc peste 5 ml apă distilată. În momentul fotometrării se adaugă 0,5 ml reactiv Nessler [5]. Se fotometrează imediat în cuva de 1 cm grosime de strat cu filtrul S_{42}, la fotometrul Pulfrich cu dispozitiv Elpho, sau S_{47}, la fotometrul Pulfrich sau I.O.R.

Proba martor se lucrează în același fel, utilizîndu-se 1 ml apă distilată în loc de ser: densitatea optică a martorului se scade din densitatea optică a probei (densitățile optice ale probelor martor obținute în condițiile de lucru citate au variat între 0,08 și 0,15).

TEHNICA DE LUCRU PENTRU MICROMETODĂ

Peste 1 ml soluție NaCl tamponată (reactivul *1*) se pipetează 0,2 ml ser și 0,1 ml extract de urează. După 15 min de incubare la temperatura laboratorului (20—25°) se deproteinizează cu 1 ml acid tricloracetic (reactivul *2*). După centrifugarea amestecului, se introduc 0,5 ml din supernatant peste 5 ml apă distilată.

După adăugarea a 0,5 ml reactiv Nessler se fotometrează în aceleaşi condiţii ca pentru macrometodă.

Curba de etalonare pentru macrometoda propusă este redată în figura 1, iar curba de etalonare pentru micrometodă în figura 2.

Din figurile 1 şi 2 se observă valabilitatea legii Lambert-Beer cel puţin pînă la 250 mg uree pentru macrometodă şi 220 mg/100 ml pentru

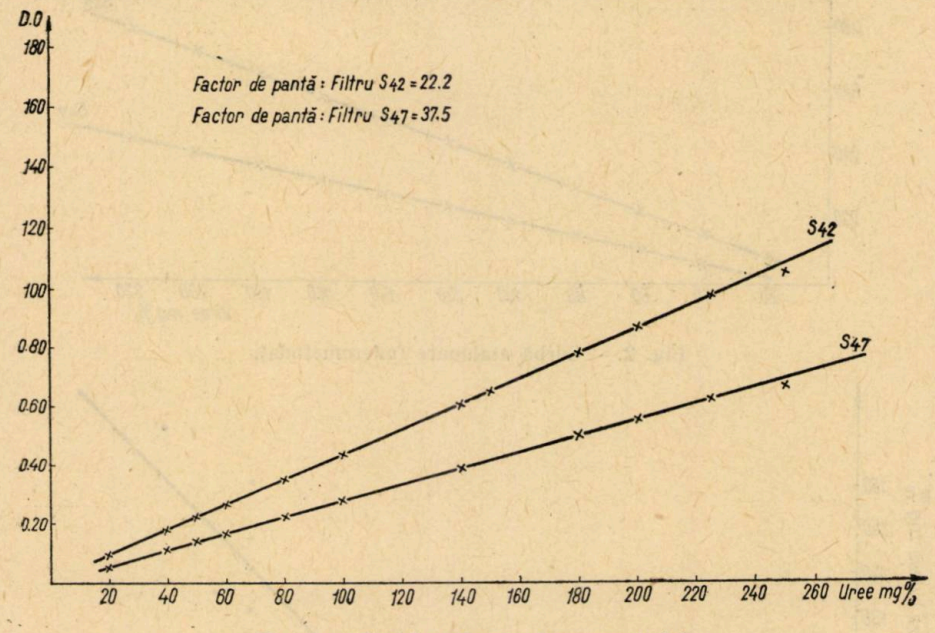


Fig. 1. — Curbă etalonare (macrometoda).

micrometodă : pentru concentraţii mai mari se va lucra pe cantităţi mai mici de supernatant. De exemplu : în loc de 0,2 ml se va lua 0,05—0,1 ml filtrat, ţinîndu-se seama de aceasta la calculul rezultatelor.

În condiţiile de lucru ale metodei, pH-ul final al soluţiei este 10,6 ; culoarea se developează instantaneu şi rămîne neschimbată timp de 10—15 minte la temperatura laboratorului.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma unui studiu comparativ între macrometoda propusă şi metoda Kowarsky, efectuat pe 110 cazuri, cu scopul de a stabili limitele de compatibilitate între cele două tehnici, s-a constatat că în diagrama de dispersie punctele sînt repartizate în marea majoritate deasupra bisectoarei sistemului rectangular de coordonate (fig. 3).

În mod analog s-a construit figura 4 pe 47 de cazuri pentru micrometoda propusă, în comparaţie cu metoda Kowarsky luată ca etalon, obţinîndu-se aceeaşi repartiţie ca în primul caz.

Din figurile 3 şi 4, în care rezultatele obţinute prin metoda Kowarsky sînt trecute în abscisă, iar cele obţinute prin metodele propuse de noi în ordonată, dispersia norului de puncte obţinut permite o evaluare a corelaţiei dintre metodele comparate.

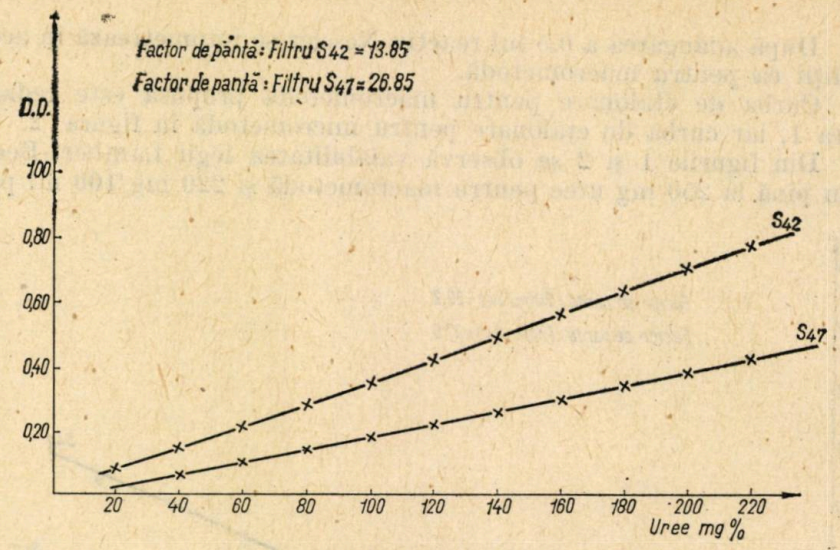


Fig. 2. — Curbă etalonare (micrometoda).

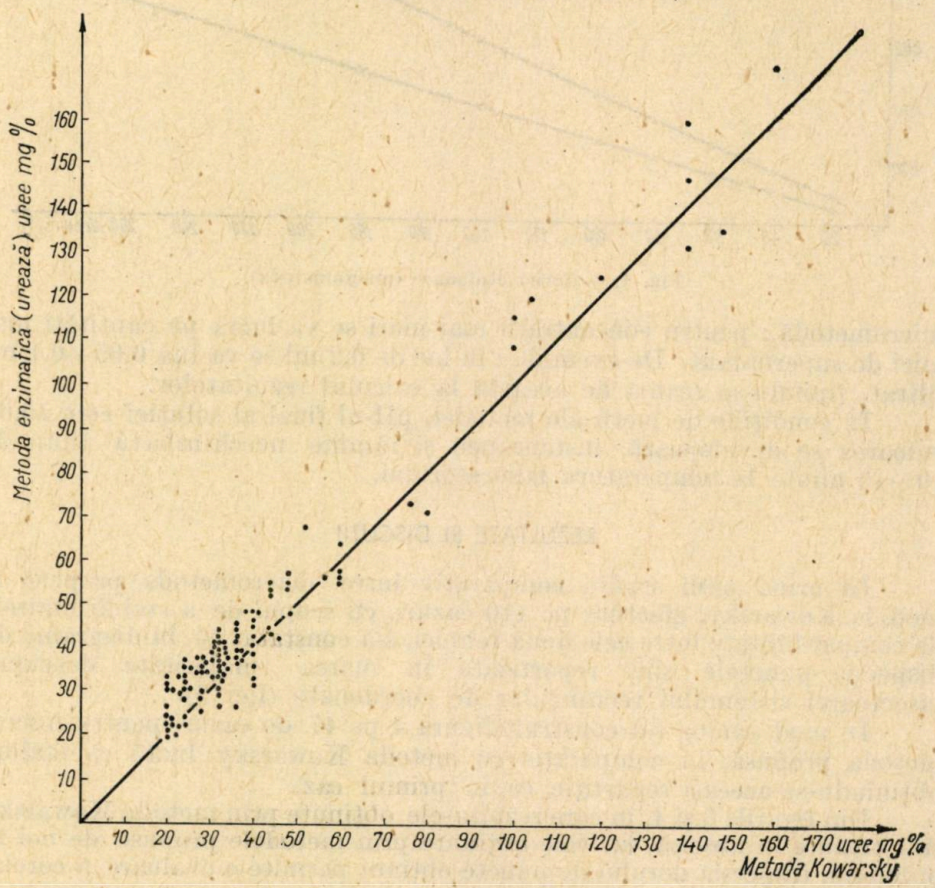


Fig. 3. — Studiu comparativ între metoda Kowarsky luată ca etalon și metoda propusă (macrometoda).

Rezultatele calculelor statistice [2—4] atestă o corelaţie satisfăcătoare între metodele propuse şi metoda Kowarsky, exprimată prin coeficienţii de corelaţie din tabelele 1 şi 2.

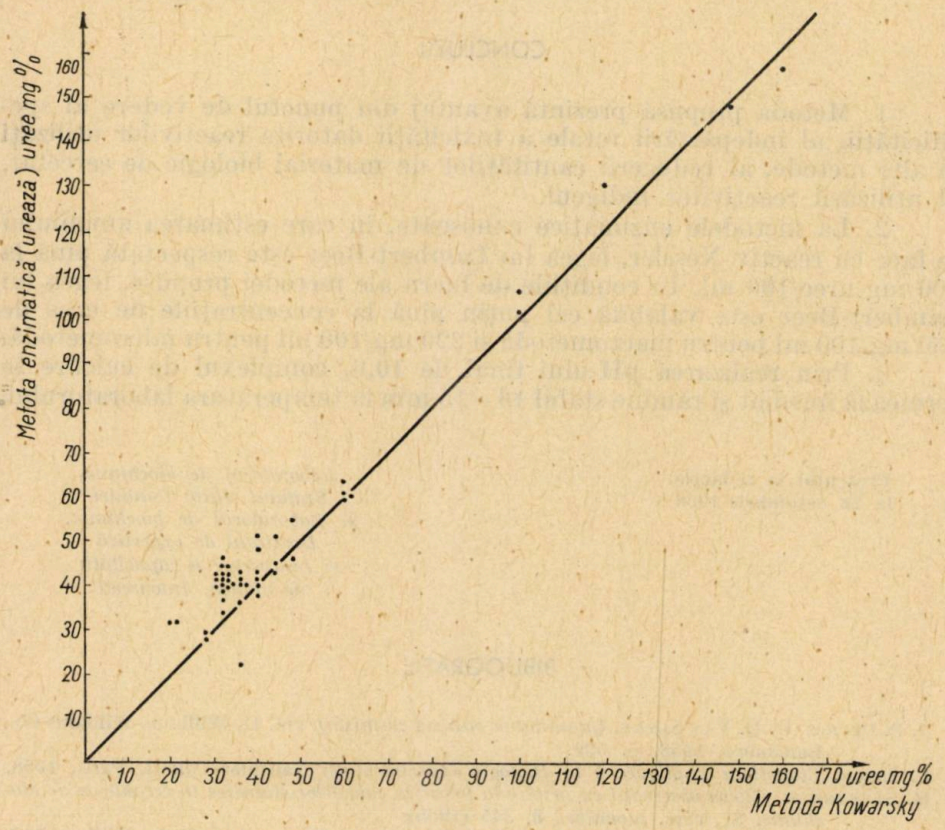


Fig. 4. — Studiu comparativ între metoda Kowarsky luată ca etalon şi metoda propusă.

Tabela 1

Metoda	Numărul de cazuri	Media	Abatere standard	Eroarea standard a mediei	Coeficient de corelaţie
Kowarsky	102	35,216	11,53	1,142	0,693
Macro	102	38,236	11,98	1,186	

Tabela 2

Metoda	Numărul de cazuri	Media	Abatere standard	Eroarea standard a mediei	Coeficient de corelaţie
Kowarsky	44	38,86	4,54	±0,684	0,764
Micro	44	42,73	4,75	±0,716	

Din datele obţinute rezultă că metoda enzimatică duce la valori cu aproape 10% mai mari decît cele obţinute cu metoda Kowarsky (după cum reiese din tabelele 1 şi 2).

CONCLUZII

1. Metoda propusă prezintă avantaj din punctul de vedere al specificităţii, al îndepărtării totale a toxicităţii datorite reactivilor utilizaţi în alte metode, al reducerii cantităţilor de material biologic de cercetat, al utilizării reactivilor indigeni.

2. La metodele enzimatice cunoscute, în care estimarea amoniului se face cu reactiv Nessler, legea lui Lambert-Beer este respectată pînă la 100 mg uree/100 ml. În condiţiile de lucru ale metodei propuse, legea lui Lambert-Beer este valabilă cel puţin pînă la concentraţiile de uree de 250 mg/100 ml pentru macrometodă şi 220 mg/100 ml pentru micrometodă.

3. Prin realizarea pH-ului final de 10,6, complexul de culoare se formează imediat şi rămîne stabil 10—15 min la temperatura laboratorului.

Prezentat la redacţie
la 28 octombrie 1966

Laboratorul de biochimie,
Spitalul clinic Panduri
şi Laboratorul de biochimie,
Institutul de expertiză
şi recuperare a capacităţii
de muncă, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. J. P. Peters, D. D. Van Slyke, *Quantitative clinical chemistry*, vol. II, Williams-Williams Co., Baltimore, 1958, p. 539.
2. L. Lison, *Statistique appliquée à la Biologie expérimentale*, Gauthier-Villard, Paris, 1958.
3. H. Sluşanschi, *Cîteva observaţii cu privire la folosirea calculelor statistice în cercetările de biochimie*, St. cerc. biochim., **8**, 345 (1965).
4. M. Lamotte, *Initiation aux méthodes statistique en biologie*, Masson Co., Paris, 1957, p. 112.
5. W. Massmann, *The basis of Nessler's reaction in clinical chemistry and its use for urea estimations*, Z. anal. Chem., **193**, 332 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 273–278 (1967)

VARIAŢII INDIVIDUALE ÎN PRODUCEREA ANTICORPILOR PRECIPITANŢI LA COBAII INOCULAŢI CU γG-GLOBULINĂ SAU PROTEINE SERICE DE IEPURE

STUDIU IMUNOELECTROFORETIC

SILVIA MIHĂESCU şi VICTOR GHEŢIE

576.8.097

Rezumat. — Cobaii imunizaţi cu ser sanguin de iepure nu au produs anticorpi faţă de γG-globulină (9 animale), iar din cei imunizaţi cu γG-globulină pură (10 animale) numai 3 au dat răspuns imun bun.

În serul animalelor care nu au format anticorpi faţă de γG-globulină s-a constatat persistenţa îndelungată a antigenului în circulaţie. Lipsa răspunsului imun şi persistenţa γG-globulinei în organism sînt atribuite incapacităţii macrofagelor de a pinocita antigenul, şi nu supradozării cantităţii de antigen inoculate sau asemănării structurale dintre γG-globulina de iepure şi cobai.

Anticorpii de cobai anti-γG-globulină de iepure reacţionează puternic cu lanţul polipeptidic H şi mai slab cu lanţul L.

Studiul imunochimic al imunoglobulinelor de iepure, intacte sau fragmentate, se realizează în mod obişnuit cu ajutorul antiserurilor obţinute prin imunizarea unor animale de experienţă mari (capră [1], oaie [2], măgar [3], cal [4]).

Neavînd la dispoziţia noastră aceste specii de animale şi apreciind că acest inconvenient poate interveni şi la alţi experimentatori, ne-am propus să alegem o altă specie de animale de laborator, mai accesibilă, dar care să poată furniza totuşi cantităţi suficiente de antiser. Desigur, am luat în considerare numai speciile de animale care sînt suficient de îndepărtate taxonomic de specia iepure (pentru a putea produce anticorpi faţă de imunoglobulinele iepurelui). Am ales cobaiul, deoarece lucrări recente [2], [5], [6], semnalînd răspunsul imun rapid, puternic şi constant al cobaiului la antigene proteice şi haptene, consideră că acesta este un excelent producător de anticorpi precipitanţi. Am exclus din cîmpul nostru de experimentare, cel puţin deocamdată, păsările, deşi acestea sînt cunoscute ca foarte bune producătoare de anticorpi, deoarece analiza imunoelectroforetică cu antiseruri de pasăre cere condiţii speciale de executare [7]. Aşadar, scopul acestei lucrări a fost de a stabili dacă cobaiul poate fi folosit ca un producător eficient de anticorpi anti-γG-globulină de iepure şi, în caz afirmativ, de a caracteriza, sub aspect imunoelectroforetic, componenţa şi calitatea antiserurilor produse.

MATERIAL ŞI METODE

S-au utilizat cobai din linii neselecţionate, în greutate de 300—350 g. Ei au fost împărţiţi în două loturi, de 9 (lotul A) şi, respectiv, 10 animale (lotul B).

Animalele din lotul A (notate de la 1 la 9) au fost inoculate cu ser de iepure proaspăt recoltat, în aceeaşi schemă de hiperimunizare, şi anume : fiecare animal a primit săptămînal cîte o injecţie de 0,25—0,5 ml ser de iepure, emulsionat într-un volum egal de adjuvant Freund complet. Sîngerările s-au făcut la 2 luni de la începerea imunizării şi la 7—10 zile de la ultima injecţie.

Cobaii din lotul B au fost împărţiţi în două subloturi, fiecare de cîte 5 animale. Animalele din unul din subloturi (notate de la 10—14) au fost injectate cu γG-globulină de iepure agregată prin căldură. Animalele din celălalt sublot (notate de la 15 la 19) au primit primele două injecţii cu γG-globulină-anticorp legată de un imunosorbent celulozic de care era prins antigenul corespondent. În celelalte injecţii, animalele au primit γG-globulină agregată prin căldură, ca şi primul sublot. S-a utilizat pentru imunizare γG-globulină legată de celuloză, deoarece s-a arătat că sub această formă antigenul declanşează un răspuns imun puternic [8]. Din aceleaşi motive s-a folosit şi γG-globulina agregată prin căldură, stare sub care γG-globulina pare mai antigenică [9].

Schema de hiperimunizare aplicată ambelor subloturi a fost următoarea : fiecare animal a primit săptămînal cîte o injecţie de 5—8 mg γG-globulină dizolvată în soluţie salină fiziologică şi emulsionată într-un volum egal de adjuvant Freund complet.

Animalele au fost sîngerate, ca şi cele din lotul A, la 7—10 zile de la ultima injecţie şi la o lună şi jumătate de la începerea imunizării.

Sîngerarea s-a făcut prin puncţie cardiacă, prelevîndu-se circa 10 ml sînge. Această operaţie poate fi repetată, fără repercusiuni asupra stării de sănătate a animalului, tot la 10 zile. Un animal poate fi puncţionat de 5—6 ori, astfel că el poate furniza 20—25 ml antiser.

γG-globulina de iepure a fost obţinută prin precipitarea serului cu sulfat de amoniu 33% şi cromatografierea pe DEAE-celuloză cu tampon de fosfaţi 0,02 M, pH 8,0 [10].

γG-globulina de iepure legată specific de imunosorbent s-a preparat astfel : serul de iepure antialbumină de bou a fost absorbit cu albumină serică de bou legată de MABOM*-celuloză [11]. Precipitatul s-a spălat de cîteva ori cu soluţie salină fiziologică, şi în final s-a suspendat în soluţie salină fiziologică. Agregarea γG-globulinei s-a realizat prin încălzirea soluţiei la 60°C, 15 min [9].

Lanţurile polipeptidice L şi H ale γG-globulinei de iepure au fost obţinute prin reducere cu tioglicolat de sodiu şi cromatografie pe Sephadex G-100, cu acid acetic N, printr-un procedeu indicat în altă lucrare [12].

Albumina de iepure a fost izolată după procedeul lui S. Michael [13]. Preparatul obţinut prezintă omogenitate electroforetică.

Serul imun de iepure anti-ser sanguin de cobai şi serul de capră anti-ser sanguin de iepure ne-au fost puse la dispoziţie de dr. N. Şt. Chişiu de la Spitalul „Dr. I. Cantacuzino" din Bucureşti. Serul de măgar anti-γG-globulină de iepure l-am obţinut prin bunăvoinţa dr. R. S. Nezlin de la Institutul de biologie moleculară din Moscova.

Imunoelectroforeza s-a executat în tampon veronal-veronal sodic, pH = 8,6, putere ionică 0,05 în cuvă şi 0,016 în plăci. Potenţialul a fost de 20 V/cm, intensitatea nu a depăşit 1 mA/cm, iar timpul de migrare a variat între 1,5 şi 2 ore.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din lotul A de 9 cobai injectaţi cu ser de iepure integral, nici un animal nu a produs anticorpi antialbumină şi anti-γG-globulină (fig. 1).

* MABOM = *m*-aminobenzil-oximetil.

Se constată că linia de precipitare caracteristică γG-globulinelor nu este dată de nici un antiser analizat. De asemenea se constată absența liniei de precipitare caracteristică albuminei; numai la cobaii 5 și 6 se observă o linie de precipitare foarte slabă în zona albuminei, atît de slabă încît nici nu poate fi reprodusă fotografic. Linia de precipitare bine conturată, aflată la extremitatea anodică a plăcii, corespunde probabil α_1-glicoproteinei, proteină puternic antigenică, prezentă în toate spectrele imunoelectroforetice. Absența anticorpilor antialbumină am confirmat-o și prin analize directe, în care nu am reușit să evidențiem o reacție de imunoprecipitare între albumina de iepure purificată și antiserurile de cobai testate.

Dintre liniile de precipitare care pot fi identificate în spectrul imunoelectroforetic prin forma și poziția lor caracteristică, notăm prezența în aproape toate antiserurile analizate a glicoproteinelor α_1 și α_2, a lipoproteinelor α_1, α_2 și β și a unor proteine din clasa β_1-globulinelor. Linia de precipitare pentru transferină este de asemenea prezentă la majoritatea antiserurilor, fiind bine vizibilă la cobaiul 7. Dintre liniile de precipitare care sînt date numai de anumite antiseruri, poate fi considerată linia de precipitare dinspre extremitatea catodică a plăcii (reacție pozitivă cu negrul de Sudan*), dată de serurile cobailor 3, 4 și 6, și o linie netă, indicată cu o săgeată în figură, care este vizibilă la cobaii 4, 6 și 7. Este de notat că linia pentru γ M-globulină nu a fost obținută cu nici unul dintre serurile analizate.

Din aceste rezultate se poate trage concluzia că cobaii formează ușor anticorpi precipitanți antiiepure, însă numai pentru acele proteine serice care sînt cunoscute că posedă o antigenicitate marcată (glico- și lipoproteinele) [14]. Astfel, din 9 cobai injectați, 6 au furnizat antiseruri puternice care au dezvoltat linii de precipitare nete cu serul de iepure (cobaii 1, 3, 4, 5, 6 și 9). Chiar acei cobai (2, 7 și 8) care nu dezvoltă linii intense, dau un număr de linii de precipitare comparabil cu al celorlalți cobai. Numărul liniilor de precipitare formate a variat de la animal la animal, fiind cuprins între 4 și 9.

Faptul că cobaii nu formează anticorpi față de albumine și γG-globuline (pentru a nota numai proteinele identificate care n-au anticorpi corespondenți în antiserurile analizate) ar putea fi explicat fie prin acaparrarea activității celulelor anticorpoformatoare de către proteinele cu o antigenicitate mai mare (competiția antigenelor), fie prin existența unor asemănări structurale marcate între iepure și cobai la nivelul acestor două proteine.

Indiferent de veracitatea acestor explicații, rămîne cert faptul că, în condițiile noastre de experiență, cobaiul nu s-a arătat a fi un animal capabil să producă anticorpi față de γG-globulina de iepure, atunci cînd i se administrează ser sanguin integral de iepure.

Injectarea cobailor numai cu γG-globulină de iepure a arătat că, la sublotul care a primit primele două injecții cu γG-globulină legată de celuloză, 2 din 5 cobai au format anticorpii specifici, iar la cei imunizați numai cu γG-globulină în asociație cu adjuvant Freund numai 1 din 5

* Prezența unei lipoproteine distincte într-o linie de precipitare etalată în zona γA-globulinelor a fost constatată și la serul de om de N. Șt. Chișiu (comunicare personală).

a produs anticorpi specifici. Toţi cobaii însă au făcut anticorpi faţă de o impuritate existentă în preparatul de γG-globulină (probabil transferina [15]) (fig. 2).

Această comportare, alăturată de procentul mic de animale care au anticorpi specifici (30%), atestă încă o dată slaba antigenicitate a γG-globulinei de iepure pentru cobai.

Dintre cei 3 cobai care au anticorpi anti-γG-globulină de iepure, unul (15) are o comportare imunoelectroforetică deosebită: linia pentru γG-globulină este dublă (fig. 3). Dublarea liniei nu pare a fi un artefact, prin excesul unuia din reactanţi, deoarece ea s-a menţinut la diferite seruri analizate. De asemenea, linia din interior, mai scurtă, întretaie linia mai lungă, cînd aceasta din urmă se uneşte cu linia unică de precipitare formată de serul de capră antiiepure cu γG-globulina de iepure (fig. 3). Această comportare, semnalată şi la unele seruri de cal antiom [16], ar putea fi determinată de o eterogenitate a γG-globulinelor de iepure, care se poate reflecta în anticorpii cobaiului menţionat. De altfel, o eterogenitate imunoelectroforetică în sînul clasei γG-globulinelor la cobai a fost deja semnalată [17].

La cobaii care n-au făcut anticorpi anti-γG-globulină de iepure se constată persistenţa îndelungată în sînge a acestui antigen. Astfel, γG-globulina de iepure a putut fi identificată în circulaţie, prin tehnica Osserman, chiar la 3 săptămîni de la injectarea subcutanată, în asociaţie cu adjuvant Freund, a 5 mg de γG-globulină de iepure (fig. 4).

Se observă racordarea liniei de precipitare caracteristică γG-globulinelor de iepure la linia transversală dată de reacţia antigenului prezent în serul cobaiului analizat cu anticorpii anti-γG-globulină. Această reacţie nu poate fi pusă pe socoteala unei asemănări antigenice între γG-globulina de cobai şi cea de iepure, deoarece serul de măgar anti-γG-globulină de iepure nu reuşeşte să precipite γG-globulinele de cobai.

Prezenţa îndelungată a γG-globulinelor de iepure în sînge, după ce acestea au străbătut intacte bariera limfatică (injecţia a fost subcutanată), este în contradicţie atît cu absenţa unei înrudiri antigenice evidente între γG-globulina donatorului şi aceea a receptorului, cît şi cu faptul că γG-globulina a fost agregată termic tocmai pentru a o face mai accesibilă pinocitozei, şi deci eliminării ei din circulaţie.

Absenţa răspunsului imun, asociată cu persistenţa antigenului în circulaţie, este o manifestare tipică a toleranţei sau paraliziei imunologice. De aceea, se poate pune întrebarea dacă la aceste animale doza administrată nu a fost prea mare şi a inhibat răspunsul imun specific. Fără a putea îndepărta complet această posibilitate, experienţele noastre arată că ea este destul de redusă dacă ţinem cont de existenţa răspunsului imun la celelalte animale (supuse aceleiaşi scheme de imunizare), ca şi de persistenţa neaşteptat de îndelungată în *circulaţie* a unui antigen injectat *subcutanat*. De aceea, considerăm că în aceste cazuri persistenţa este mai degrabă determinată de dificultatea pe care o manifestă macrofagele la pinocitarea antigenului. Incapacitatea macrofagelor de a pinocita o proteină străină organismului, dotată cu o structură antigenică aparent diferită, arată că în recunoaşterea caracterului de străin (*non-self*) organismul poate avea diferite trepte de reactivitate: de la desfacerea macromoleculei în unităţi structurale elementare pînă la păstrarea nealterată a

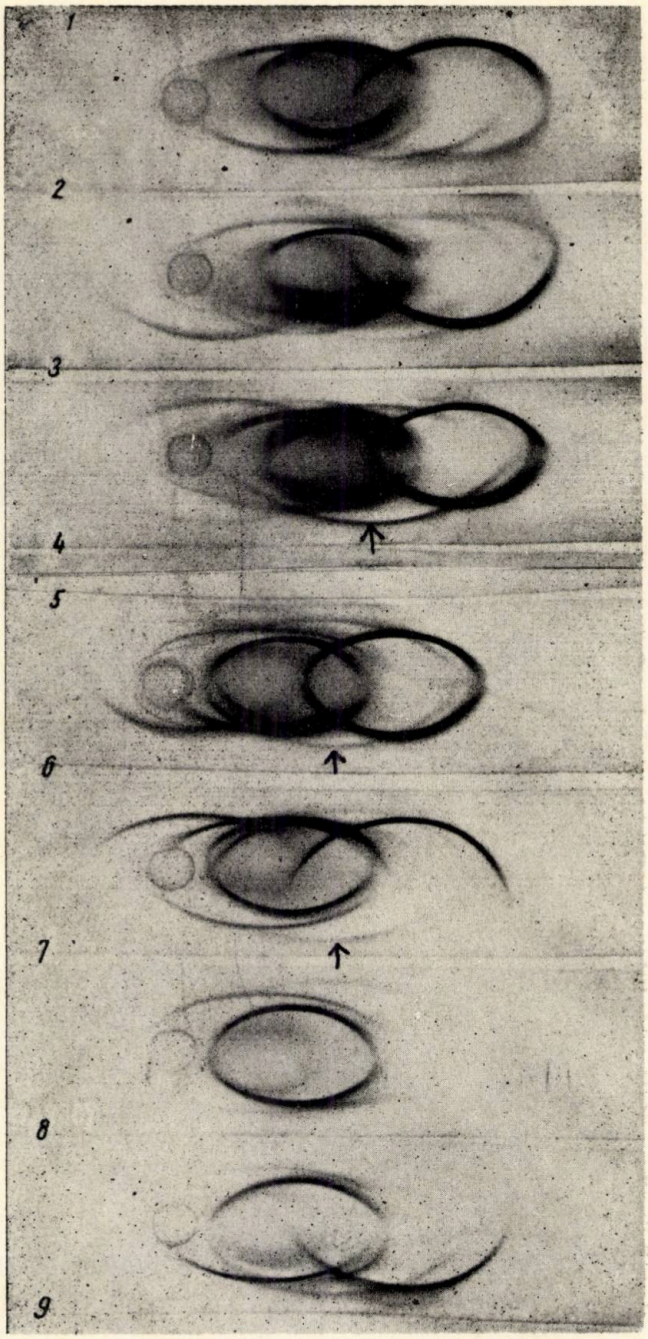


Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a serului de iepure cu diferite seruri imune de cobai antiiepure. În godeuri s-a introdus serul de iepure. Șanțurile au fost umplute cu serurile imune de cobai antiiepure (cobaii 1—9). Anodul este în dreapta.

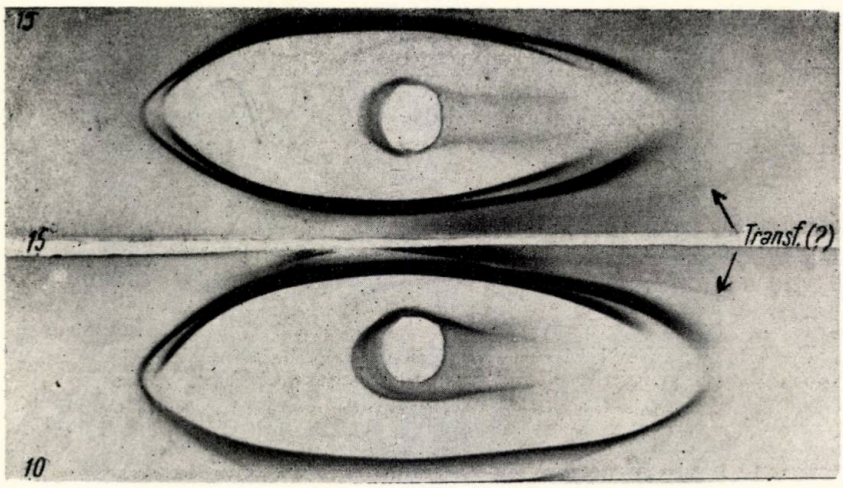


Fig. 2. — Analiza imunoelectroforetică a γG-globulinei de iepure cu două seruri imune de cobai anti-γG-globulină de iepure. În godeuri s-a introdus γG-globulina de iepure. Şanţurile superior şi median au fost umplute cu serul cobaiului 15, iar cel inferior cu serul cobaiului 10. Anodul este în dreapta.

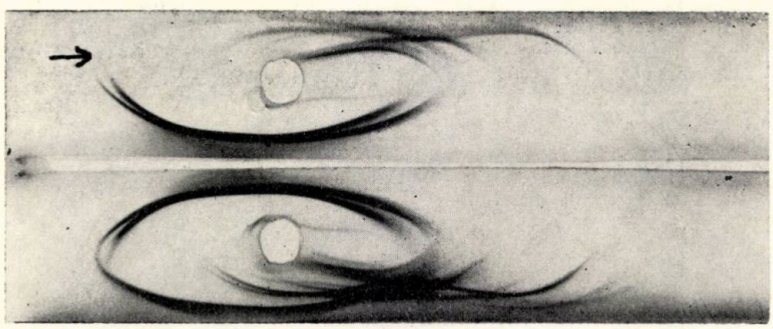


Fig. 3. — Analiza imunoelectroforetică comparativă a γG-globulinei de iepure cu ser imun de capră antiiepure şi cu ser imun de cobai anti-γG-globulină de iepure. În godeuri s-a introdus ser de iepure. Şanţurile superior şi inferior au fost umplute cu ser de capră antiiepure (două diluţii diferite), iar cel median cu ser de cobai anti-γG-globulină de iepure (cobaiul nr. 15). Săgeata indică locul de intersecţie al liniilor de precipitare. Anodul este în dreapta.

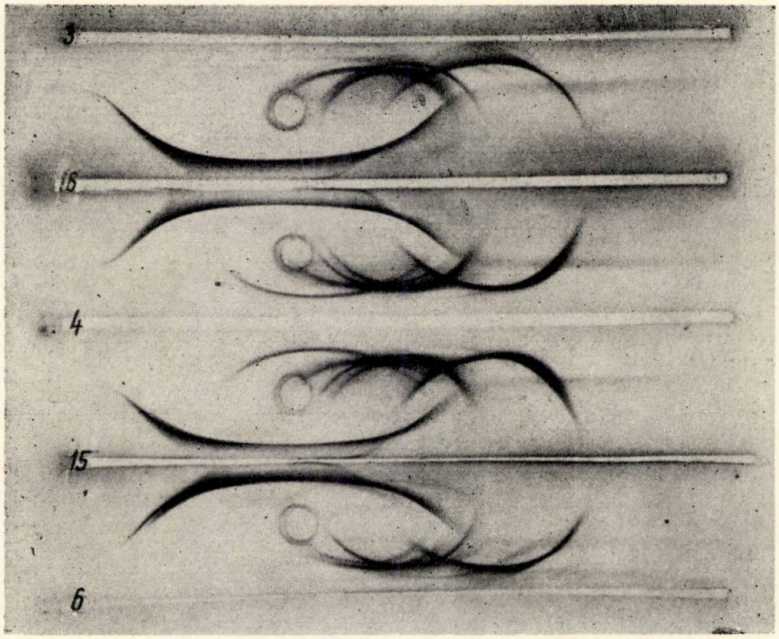


Fig. 4. — Identificarea imunoelectroforetică a γG-globulinei de iepure în sîngele unor cobai. În godeuri s-a introdus ser de iepure. În şanţuri au fost introduse serurile cobailor 3, 4, 6, 15, 16. Cobaii 3, 4 şi 6 n-au produs anticorpi anti-γG-globulină, dar în serul lor se găseşte γG-globulina de iepure (racordarea liniei transversale la linia de precipitare a γG-globulinei). Serurile cobailor 3, 4 şi 6 au fost recoltate la 14 zile de la ultima inoculare. Anodul este în dreapta.

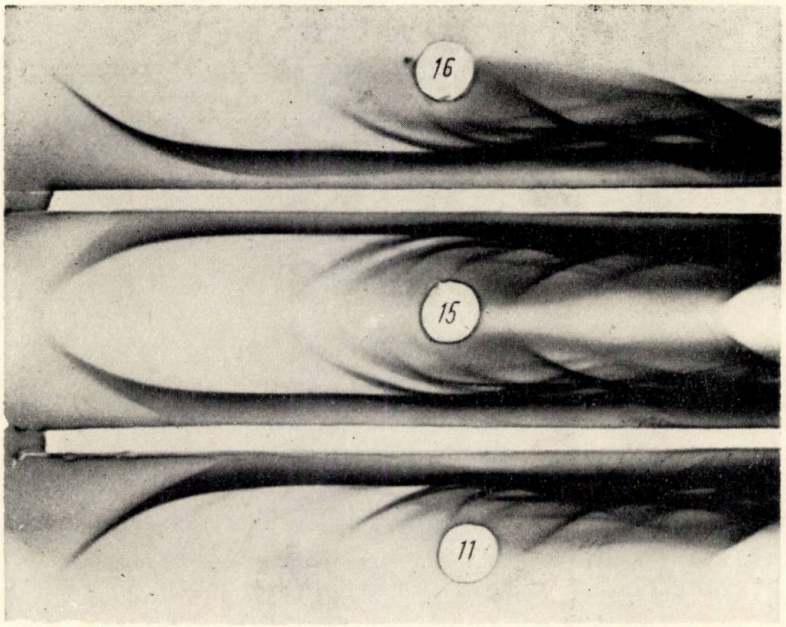


Fig. 5. — Analiza imunoelectroforetică a serurilor de cobai cu ser de iepure anticobai. În godeuri s-au introdus serurile cobailor 15, 16 şi 11. Anodul este în dreapta.

structurii inițiale. În acest ultim caz, proteina străină trece în organism fără a lăsa „urme" în sistemul anticorpoformator.

Între serul cobailor care au făcut anticorpi față de γG-globulina de iepure și cei care n-au făcut anticorpi decît pentru impuritate (transferina?) nu există deosebiri semnificative detectabile cu ajutorul serului de iepure anticobai utilizat de noi.

În sistemul *gamma*-globulinic al tuturor cobailor cercetați se observă componentul γ_2G-globulinic [5], [6]. Prezența γ_1G-globulinei, ca și a altor componenți din zona *gamma* (linii de precipitare așezate sub γ_2G), este sporadică și se constată atît la cobaii care au făcut anticorpi față de γG-globulina de iepure, cît și la cei ce au produs anticorpi numai față de impurități (fig. 5). Deci, absența reactivității imunologice față de γG-globulina de iepure la acești cobai nu este cauzată de o deficiență a sintezei proteinelor din sistemul *gamma*, ci, după cum am arătat mai sus, de o deficiență în reținerea antigenului în țesuturi.

Anticorpii de cobai anti-γG-globulină de iepure sînt capabili să reacționeze și cu lanțurile polipeptidice ce alcătuiesc molecula intactă. Reacția cu lanțul H este vizibilă atît la imunoelectroforeză, cît și la dubla difuzie, în timp ce lanțul L dă o linie de precipitare numai în testul de dublă difuzie [18]; deoarece testul de dublă difuzie are o sensibilitate mai mare decît cel imunoelectroforetic [19], rezultă că anticorpii capabili să se unească cu lanțul L se găsesc în cantitate mai mică.

Aceste date se pot încadra printre cele din literatură, care au arătat că serurile anti-γG-globulină pot reacționa vizibil fie cu lanțurile H și nu cu cele L [1], fie cu lanțurile L și nu cu cele H [20], fie cu ambele lanțuri [21]. Deci, grupări determinante „ascunse" fie în lanțul L, fie în lanțul H, fie rezultate din interacțiunea reciprocă a lanțurilor pot da naștere la tot atîtea feluri de anticorpi cu specificitate determinată.

CONCLUZII

Cobaii nu formează anticorpi față de γG-globulina de iepure, dacă li se injectează ser de iepure total. Absența anticorpilor anti-γG-globulină de iepure din aceste antiseruri de cobai nu se poate explica numai prin competiția dintre antigene, deoarece cobaii nu produc decît într-un procent redus (30%) anticorpi față de γG-globulina de iepure, chiar cînd aceasta este administrată singură (pură). Reactivitatea scăzută a cobailor în raport cu γG-globulina de iepure nu este cauzată de asemănări în structura antigenică; serul de măgar anti-γG-globulină de iepure nu reacționează prin imunodifuzie cu γG-globulina de cobai.

Persistența îndelungată a γG-globulinei de iepure la cobaii care n-au format anticorpi specifici sugerează că răspunsul imun ar putea fi inhibat de concentrația mare de antigene (paralizie imunologică). Păstrarea antigenului la un nivel ridicat se datorește, după părerea noastră, incapacității macrofagelor de a pinocita antigenul, și nu supradozării cantității de antigen inoculate.

Prezentată la redacție
la 13 martie 1967

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. J. B. FLEISCHMAN, R. H. PAIN, R. R. PORTER, *Reduction of γ-globulins*, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 174 (1962).
2. G. J. THORBECKE, E. C. FRANKLIN, *Antigenic cross-reactivity between 7S and 19S rabbit γ-globulin*, J. Immunol., **87**, 753 (1961).
3. A. J. KULBERG, I. A. TARKHANOVA, N. I. KHRAMKOVA, *The antigenic structure of rabbit γ-globulin*, Folia biologica, **7**, 213 (1961).
4. J. B. FLEISCHMAN, R. R. PORTER, E. M. PRESS, *The arrangement of the peptide chains in γ-globulin*, Biochem. J., **88**, 220 (1963).
5. B. BENACERRAF, Z. OVARY, K. J. BLOCH, E. C. FRANKLIN, *Properties of guinea pig 7S antibodies 1. Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7S antibodies*, J. exp. Med., **117**, 937 (1963).
6. R. A. BINAGHI, *Production of 7S immunoglobulins in immunized guinea pigs*, J. Immunol., **97**, 159 (1966).
7. C. H. TEMPELIS, M. F. LOFY, *An adaptation of the immunoelectrophoretic method for the use of chicken-precipitating antisera*, J. Immunol., **95**, 418 (1965).
8. A. M. OLOVNIKOV, A. E. GURVICH, *Immunization (in rabbits) with protein-cellulose co-polymer (immunosorbent)*, Nature, **209**, 417 (1966).
9. C. E. BIRO, GUADALUPE GARCIA, *The antigenicity of aggregated and aggregate-free gamma-globulin for rabbits*, Immunology, **8**, 411 (1965).
10. J. L. FAHEY, A. P. HORBETT, *Human gamma-globulin fractionation on anion exchange cellulose columns*, J. biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
11. A. E. GURVICH, *The use of antigens on an insoluble support*, în J. F. ACKROYD, *Immunological methods*, Blackwell, Oxford, 1964, p. 113.
12. S. MIHĂESCU, *Distribution of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonic acid in the polypeptide chains of rabbit γG-globulin*, Rev. roum. Biochim., **4**, 41 (1967).
13. S. MICHAEL, *The isolation of albumin from blood serum or plasma by means of organic solvents*, Biochem. J., **82**, 212 (1962).
14. P. GRABAR, P. BURTIN, *Immuno-electrophoretic analysis*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964, p. 99—108.
15. J. S. BAUMSTARK, R. J. LAFFIN, W. A. BARDAWIL, *A preparative method for the separation of 7S gamma-globulin from human serum*, Arch. Biochem. Biophys., **108**, 514 (1964).
16. P. GRABAR, P. BURTIN, *Immuno-electrophoretic analysis*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964, p. 114.
17. G. J. THORBECKE, B. BENACERRAF, Z. OVARY, *Antigenic relationship between two types of 7S guinea pig γ-globulins*, J. Immunol., **91**, 670 (1963).
18. S. MIHĂESCU, *L'hétérogénéité de la chîne polypeptidique L de l'Ig G de lapin. Etude électrophorétique et immunoelectrophorétique en gel d'agarose avec uree 3M*, Rev. roum. Biochim., **4**, nr. 3 (1967).
19. V. GHEŢIE, V. MICUŞAN, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1966, p. 316.
20. J. L. FAHEY, *Structural basis for the differences between type I and type II human γ-globulin molecules*, J. Immunol., **91**, 448 (1963).
21. V. GHEŢIE, *Fluoroimmunoelectroforeza*, St. cerc. biochim., **9**, 359 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 279–285 (1967)

REACTIVITATEA BIOCHIMICĂ ŞI IMUNOLOGICĂ A MACROFAGULUI HISTIOID ÎN TUBERCULOZĂ

V. ACŢIUNEA UNOR ANTIGENE MICOBACTERIENE ASUPRA STRUCTURILOR LIZOSOMALE ALE MACROFAGULUI HISTIOID DE LA ANIMALUL NORMAL ŞI VACCINAT B.C.G.

EUG. PĂUNESCU, RODICA MUŞĂŢEANU, MARINA STOINESCU şi CORNELIA ZAHARESCU

576.8.098

Rezumat. — În cadrul studiilor privind specificitatea mecanismelor de rezistenţă în infecţia tuberculoasă, s-a investigat acţiunea *in vitro* a unor componente antigenice micobacteriene asupra morfologiei şi activităţii enzimatice a lizosomilor macrofagelor provenite de la animalul normal şi vaccinat cu B. C. G.

În prezenţa componentei haptenice P. P. D.(10—1 000 μg/ml) şi a unui extras somatic cu ulei-apă, atît macrofagele normale, cît şi cele „imune" prezintă numai unele modificări reversibile ale lizosomilor, fără liberarea extracelulară a enzimelor lizosomale. În schimb, două fracţiuni antigenice complete (o tuberculoproteină somatică şi dializatul digeratului cu tripsină al corpilor bacilari delipidaţi) induc modificări morfologice ireversibile şi liberarea extracelulară a enzimelor lizosomale, însă numai în cazul macrofagelor de la animalele vaccinate B. C. G., ceea ce pledează pentru specificitatea imunologică a reacţiei.

Sînt discutate natura şi specificitatea proceselor de sensibilitate lizosomală a macrofagelor «imune» la contactul cu unele antigene micobacteriene.

Lucrările iniţiate de De Duve [1] au arătat că o serie de enzime celulare cu activitate hidrolazică la pH optim acid (fosfataza, RN-aza şi DN-aza, catepsina, β-glucuronidaza, aril-sulfataza, lizozimul), prezente în celula normală în stare inactivă, sînt activate şi liberate în citoplasmă în momentul cînd celulele suferă unele agresiuni de origine internă, metabolică (îmbătrînire) sau externă (acţiune mecanică, modificarea pH-ului ambiant etc.). În celula normală, aceste enzime sînt cuprinse într-un organit citoplasmic special — denumit *lizosom* — a cărui membrană lipoproteică trebuie să fie alterată, ca să permită activarea şi liberarea hidrolazelor acide ce le conţine.

În 1960, Cohn şi Hirsch [2] au prezentat date care dovedesc identitatea dintre lizosomi şi granulele citoplasmice din leucocitele polimorfonucleare; ulterior [3], aceste observaţii au fost extinse şi la fagocitele mononucleare. Ca urmare a fagocitării de bacterii sau chiar de particule inerte, aceste celule se degranulează şi, concomitent, liberează hidrolazele acide lizosomale, care sînt „vărsate" în vacuolele fagocitare, unde are loc digestia particulelor fagocitate [4].

În infecţia tuberculoasă, agentul patogen este găzduit intracelular, în macrofagul de origine histiocitară (M.H.), iar factorul decisiv de care depinde sensul evoluţiei infecţiei este, în ultimă analiză, soarta bacilului în fagocitul mononuclear [5], [6]. La macroorganismul vaccinat, M.H. manifestă o capacitate fagocitară crescută, a cărei eficienţă faţă de *Mycobacterium tuberculosis* este intensificată de prezenţa serului hiperimun [7].

Întrucît eficienţa procesului fagocitar depinde în mare măsură de capacitatea răspunsului lizosomal al fagocitului, prezintă interes studiul acţiunii unor fracţiuni antigenice micobacteriene asupra structurilor lizosomale ale macrofagului de la animalul imunizat (vaccinat B.C.G.), comparativ cu cele de la animalul normal. În acest sens, în nota de faţă prezentăm rezultatele cercetărilor privind modificările morfologice şi enzimatice ale M.H. normal şi imun, induse sub acţiunea unor fracţiuni micobacteriene antigenice.

MATERIAL ŞI METODĂ

Macrofagele histioide au fost obţinute, în paralel, de la cobai de crescătorie (400—500 g) normali şi vaccinaţi cu *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* atenuat, tulpina B. C. G. (10 mg microb semiumed, introduse subcutan). Între 17 şi 34 de zile de la vaccinarea B. C. G., loturi de 3—6 animale au fost sacrificate (prin fracturarea coloanei vertebrale cervicale) şi, după incizarea peretelui abdominal, cavitatea peritoneală a fost spălată cu 40 ml tampon fosfat salin pH 7,4 (T. P. S., formula Dulbecco-Vogt), heparinat 1/10 000. Lichidul de spălare, conţinînd $2-4\times10^6$ elemente/ml în cazul cobaiului vaccinat B. C. G. şi $3-5\times10^7$ elemente/ml în cazul cobaiului normal, a fost supus unei centrifugări scurte (8 min la 800—1 000 t/min), iar sedimentul obţinut, lipsit de eritrocite (85% M. H.; 5—10% limfocite; 4—12% P. M. N.), a fost reluat, după caz, în T. P. S. + 10% ser de viţel (pentru studiul modificărilor morfologice) sau în soluţie clorurosodică 0,85%, tamponată cu barbiturat (pentru determinarea biochimică a activităţii fosfatazei acide).

Modificările morfologice lizosomale au fost investigate pe culturi *in vitro* de macrofage; în acest scop, suspensia de M. H. în T. P. S. + 10% ser de viţel + antibiotice (penicilină 200 u. Oxf. şi streptomicină 50 μg/ml) a fost pusă în cutii de sticlă neutră, conţinînd lamele 22×22 mm şi lăsată 90 min la 37°C, pentru ca M. H. să adere la sticlă. Apoi, mediul de cultură a fost decantat, după agitare, eliminîndu-se în felul acesta toate elementele celuare neviabile sau care, nefiind M. H., nu aderă la sticlă. Mediul decantat a fost înlocuit cu un alt mediu similar, conţinînd însă 25% ser de viţel şi unul din antigenele micobacteriene a căror acţiune lizosomală s-a studiat. După 2 ore de incubare la 37°C, lamele s-au scos din mediu, s-au spălat rapid cu soluţie salină fiziologică şi s-au împărţit în mod egal pentru aplicarea tehnicilor de colorare vitală pentru lizosomi şi a celor de evidenţiere citochimică a fosfatazei acide lizosomale.

Coloraţia vitală pentru lizosomi s-a făcut prin metoda de fluorescenţă cu aminoacridine, preconizată de Allison şi Mallucci [8] pentru studiul modificărilor lizosomale sub acţiunea virusurilor. Calităţile colorante şi de fluorescenţă ale unor aminoacridine, ca acridin-oranjul şi eucrisina, sînt cunoscute mai de mult; însă, în timp ce în tehnica histochimică originală se utilizează colorarea celulelor *fixate* şi se pot evidenţia astfel acizii nucleici celulari (fluorescenţă verzuie), colorarea *intravitală* permite evidenţierea lizosomilor, aşa-numitele „acridine orange particles" ale lui Robbins, aminoacridina fixîndu-se pe membrana lipoproteică a acestor organite celulare. În tehnica folosită de noi, lamele cu culturi tratate de M. H., după spălare, au fost ţinute la întuneric timp de 90 min la 37°C, într-o soluţie proaspăt preparată de acridin-oranj 1/200 000 în T. F.S. cu 25% ser de viţel. După o spălare repetată în T. F. S., lamelele au fost montate în T. F. S.

şi s-a procedat imediat la examinarea la microscop cu dispozitiv de fluorescenţă. În acest scop, s-a folosit microscopul I. O. R. tip MC—1, cu lumină albastră-violetă (400—500 mμ) de la o lampă cu mercur HBO_{200}, condensator UV—1, 2 cu cîmp luminos, filtre primare BG—12/6 mm şi filtre secundare GG—11/3 mm. Examinările s-au făcut cu imersie, folosind glicerină neutră (nefluorescentă) în loc de ulei de cedru. Fotografiile s-au făcut cu filme ORWO 17 şi 12 NP, timpul de expunere variind între 1 şi 6 min.

La examenul microscopic, în aceste condiţii, lizosomii apar ca granule citoplasmice fluorescente, de culoare galbenă, iar cromatina nucleară, atunci cînd se observă, prezintă o fluorescenţă verde.

În celulele care au suferit o agresiune ce interesează integritatea lizosomilor, într-un prim stadiu se observă conglomerate de particule fluorescente (fig. 1), care traduc aglomerarea şi fuzionarea mai multor particule lizosomale [8]. Într-un stadiu mai avansat (fig. 2), numărul particulelor lizosomele care au răspuns agresiunii celulare este mult mai mare, astfel ca aria de fluorescenţă ocupă cea mai mare parte din celulă; în cazurile limită, cînd vitalitatea celulei a avut de suferit, producîndu-se citoliză şi liberarea extracelular a conţinutului lizosomal, fluorescenţa celulei scade foarte mult, observîndu-se numai cîteva urme de fluorescenţă slabă (fig. 3).

Evidenţierea citochimică a fosfatazei (fosfomonoesterazei) acide s-a făcut cu ajutorul unei variante a tehnicii uzuale Gömöri: lamelele cu culturi de M. H., după spălare cu soluţie clorurosodică fiziologică, au fost incubate 20 min la 37°C în soluţia-substrat (0,01 M β-glicerofosfat de sodiu în 0,5 M tampon acetat pH 5,0, care conţine 0,004 M azotat de plumb şi 0,05 M clorură de sodiu); apoi, după o scurtă fixare în acid acetic glacial 1%, preparatele se tratează 5 min cu o soluţie saturată de H_2S, se spală şi se montează în glicerină neutră. Pentru controlul specificităţii reacţiei s-au făcut martori în prezenţă de NaF 1/10 000 (care inhibă activitatea enzimatică).

Dacă membrana lizosomală nu a fost în prealabil permeabilizată, reacţia de evidenţiere a fosfatazei acide, nu are loc deoarece în mod normal glicerofosfatul nu pătrunde prin această membrană [1]. În cazul că membrana a suferit numai o permeabilizare, atunci lizosomii se colorează şi devin vizibili ca puncte mai mici sau mai mari (fuziune); această fază este reversibilă (vitalitatea celulei nefiind alterată) şi se observă şi la o serie de celule normale, ca rezultat al pinocitării fracţiunilor proteice ale serului eterolog (de viţel), prezent în mediul de cultură [4]. Dacă membrana lizosomală a suferit degradări avansate, atunci apar în citoplasmă zone întinse colorate, care reprezintă un număr mare de fagosomi fuzionaţi; aceste zone intens colorate, atunci cînd sînt situate la periferia fagocitului (fig. 4), indică preluarea pe cale pinocitară a agentului agresor. Ulterior, într-un stadiu mai avansat al reacţiei, întreaga citoplasmă apare intens colorată (fig. 5), corespunzînd aşa-numiţilor „citosomi", care constituie o fază finală, ireversibilă, înaintea morţii celulei. În cazurile cînd hidrolazele acide, liberate din lizosomi, au realizat degradarea avansată a structurilor interne ale fagocitelor, reacţia citochimică pentru fosfomonoesteraza acidă evidenţiază numai o grămadă de puncte negre, desenul celular fiind absent (fig. 6).

Determinarea biochimică a fosfatazei (fosfomonoesterazei) acide s-a făcut cu suspensii de M. H. în soluţie salină fiziologică tamponată, după prealabilă incubare cu antigenele micobacteriene studiate. Drept martori, cantităţi determinate de suspensii au fost incubate în aceleaşi condiţii fie numai cu soluţie clorurosodică, fie cu detergenţi (Tween 80 sau Teepol), altele fiind supuse la congelări (— 20°C) şi decongelări repetate; aceste tratamente degradează membrana lizosomală şi eliberează enzimele extracelular [1], [2], [8]. La sfîrşitul perioadei de incubare (2 ore la 37°C), suspensiile au fost centrifugate 10 min la 800 t/min, iar supernatantul obţinut s-a folosit pentru determinarea activităţii enzimatice liberate extracelular, ca rezultat al acţiunii agentului cu care au fost incubate celulele. Pentru aprecierea activităţii fosfatazice acide în supernatant, s-a folosit ca substrat β-glicerofosfatul de sodiu 0,05 M, în tampon ftalat, la pH final 5,0, fosforul anorganic liberat fiind determinat după metoda Lowry [9].

Componentele micobacteriene a căror acţiune *in vitro* asupra M. H. normal şi imun s-a studiat au fost selecţionate după criterii de antigenitate; în final au fost triate patru asemenea componente.

Fracţiunea 1 este o tuberculoproteină somatică, precipitată la pH 4,2 din extractul cu NaOH 1% al corpilor bacilari delipidaţi. Electroforetic se prezintă ca o fracţiune omogenă (fig. 7), iar analiza chimică (tabela 1) arată un conţinut proteic important (80%).

Tabela 1

Compoziţia chimică a fracţiunilor micobacteriene *1*, *2*, şi *3* studiate
(în% din substanţa uscată)

Fracţiunea	N-total	P-total	Proteină totală [2]	ARN[3]	Amino acizi[4] (ca alanină)	Substanţe reducă-toare[5] (ca glucoză)
Fracţiunea *1* (tuberculoproteină somatică)	13,413	0,17	81,1	1,9	67,4	8,15
Fracţiunea *2* (dializatul digestiei triptice)[1]	10,3	0,17	57,6	2,15	58,2	28,3
Fracţiunea *3* (extract ulei-apă)	4,306	0,227	28,7	7,83	22,1	16,7

[1] Fracţiunea *2* conţine 12.35 mg/ml substanţă uscată.

[2] Metoda biuretului.

[3] Estimarea ARN s-a făcut prin metoda Mejbaum cu orcinol (spectrofotometrare finală la 660 mμ), după extragerea ARN cu acid tricloracetic din hidrolizatul fracţiunilor studiate.

[4] Estimarea aminoacizilor s-a făcut pe hidrolizatul fracţiunilor (6 ore la 100°C în H_2SO_4 2N), prin metoda cu ninhidrină şi EDTA (Păunescu, 1966), valorile reprezentînd echivalenţi de alanină.

[5] Substanţele reducătoare au fost dozate în hidrolizatul fracţiunilor, prin metoda cu antronă, valorile reprezentînd echivalenţi de glucoză.

Fracţiunea 2 reprezintă un concentrat lichid, obţinut după dializa digeratului triptic (24 de ore la 37°C) al masei delipidate de bacili tuberculoşi umani, tulpina virulentă $H_{37}Rv$. Această fracţiune este formată din opt componente disociabile electroforetic (fig. 8) şi, după hidroliză (la 100°C în H_2SO_4 2N, timp de 6 ore la reflux), prezintă un conţinut bogat în zaharuri reducătoare (tabela 1), ceea ce denotă o concentraţie polizaharidică importantă.

Fracţiunea 3 a fost preparată prin precipitarea cu acetonă (3 vol.) a supernatantului rămas după centrifugarea la 13—15 000 *g* a unui extract cu amestec de apă distilată (1 p.) + ulei de parafină (0,85 p.) + Tween 80 (0,15 p.), obţinut din corpii bacilari delipidaţi ai tulpinii virulente $H_{37}Rv$ de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*. Această fracţiune este omogenă din punct de vedere electroforetic (fig. 9) şi de asemenea conţine o importantă cantitate de polizaharid (tabela 1).

Fracţiunile 2 şi 3, înrobate împreună în adjuvant Freund simplu (lanolină 0,15 p. + ulei de parafină 0,85 p.) şi inoculate la animalul de experienţă, provoacă o creştere importantă a rezistenţei organismului contra infecţiei tuberculoase virulente; această rezistenţă este comparabilă cu cea indusă de vaccinarea B. C. G. cu doze mari, fiind însă lipsită de starea de hipersensibilitate la tuberculină *.

Fracţiunea 4 este reprezentată de haptena P. P. D. (*purified protein derivate*), obţinută prin precipitare cu acid tricloracetic (pH 4,2) din mediul unei culturi de 8 săptămîni de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, tulpina $H_{37}Rv$.

* Eug. Păunescu, G. Algeorge, R. Mușăteanu, A. Ciolac, C. Zaharescu, Gh. Pisică, *Studiul unui antigen micobacterian vaccinant şi nesensibilizant*, Comunicare prezentată la cea de-a VII-a Sesiune ştiinţifică a Institutului clinic de ftiziologie, Bucureşti, 27—28 aprilie 1967.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 2 sînt prezentate rezultatele determinărilor activităţii fosfatazei acide lizosomale, liberată în mediu sub acţiunea diferiţilor agenţi studiaţi. După cum se observă, macrofagele supuse înghe̦ţului repetat sau detergenţilor liberează o cantitate mai mare de fosfatază atunci cînd provin de la animalul vaccinat B.C.G. decît cînd provin de la animalul normal; aceasta indică un conţinut mai mare în enzime lizosomale în cazul M.H. de la animalul imun şi, în consecinţă, un potenţial fagocitar mai mare al macrofagelor „imune", fapt semnalat şi în alte lucrări [10], [9], [7].

Tabela 2

Activitatea fosfatazei acide lizosomale, liberată extracelular de macrofagele histioide (M. H.) de la cobaii normali şi vaccinaţi B. C. G., ca urmare a contactului (2 ore la 37°C) cu diferiţii agenţi studiaţi

Proba	Activitatea fosfatazei acide * liberată extracelular de macrofagele de la			
	cobaiul normal		cobaiul vaccinat B.C.G.	
M.H. netratate (martor)	0,035±0,0025	(4)**	0,03 ±0,002	(4)
M.H. supuse congelării	0,178±0,0125	(4)	0,437 ±0,032	(4)
M.H. + Teepol (5 mg)	0,105±0,065	(2)	0,385 ±0,07	(2)
M.H. + Tween 80 (5 mg)	0,045±0,015	(2)	0,12 ±0,03	(2)
M.H. + 10 μg P.P.D.	0,025±0,0015	(2)	0,0035±0,005	(2)
M.H. + 100 μg P.P.D.	0,02 ±0,003	(3)	0,0015±0,001	(3)
M.H. + fracţiunea 1 (tuberculoproteină somatică) (10 μg)	0,03 ±0,015	(4)	0,108 ±0,022	(4)
M.H. + fracţiunea 1 (100 μg)	0,035±0,005	(4)	0,237 ±0,065	(4)
M.H. + fracţiunea 2 (dializat digestie triptică) (0,05 ml)	0,043±0,0033	(4)	0,09 ±0,018	(4)
M.H. + fracţiunea 2 (0,5 ml)	0,036±0,03	(4)	0,180 ±0,064	(4)
M.H. + fracţiunea 3 (extract ulei-apă) (10 μg)	0,033±0,015	(4)	0,045 ±0,022	(4)
M.H. + fracţiunea 3 (100 μg)	0,06 ±0,009	(4)	0,0525±0,0125	(4)

* Activitatea fosfatazei acide este exprimată în μg Pi liberat în 60 de minute, la 37°C, de supernatantul a 10^9 leucocite peritoneale.

**Cifrele în paranteză reprezintă numărul de determinări.

Dintre componentele micobacteriene studiate, fracţiunea haptenică P.P.D., chiar în concentraţii mari (1 mg/ml), nu manifestă o acţiune de punere în libertate a enzimelor lizosomale nici în cazul M.H. „imun", nici al celui normal. Dimpotrivă, fosforul anorganic (Pi) liberat de M.H. „imun" în prezenţa P.P.D. pare să scadă faţă de martor, ceea ce ar denota o acţiune enzimatică inversă, de integrare a P_i neorganic ca P-organic; această acţiune inversă nu a fost încă precizată, astfel că rămîne deocamdată ca o supoziţie. Faptul că P.P.D. nu liberează în mediu can-

tităţi evidenţiabile de enzime lizosomale este în acord cu datele publicate de Saito şi Suter [10], care, administrînd P.P.D. intravenos la şoareci vaccinaţi B.C.G., nu constată o creştere a activităţilor fosfatazei acide şi ß-glucuronidazei serice, astfel neputînd evidenţia vreo acţiune a P.P.D. asupra enzimelor lizosomale leucocitare sanguine.

Fracţiunea 2 (dializatul digeratului cu tripsină) şi, mai ales, fracţiunea 1 (tuberculoproteina somatică) exercită o importantă acţiune de liberare extracelular a enzimelor lizosomale, însă numai în cazul macrofagelor provenite de la animalul vaccinat B.C.G.; aceasta dovedeşte o sensibilitate particulară a M.H. „imun" faţă de unele componente antigenice obţinute din bacilul tuberculozei.

Fracţiunea 3 (obţinută din extractul ulei-apă) manifestă un slab efect lizosomal, la limita semnificaţiei statistice faţă de martor (M.H. netratate), care însă nu este specific : liberarea unei mici cantităţi de enzime lizosomale în prezenţa fracţiunii 3 are loc atît în cazul M.H. „imun", cît şi în al celui normal. Această fracţiune pare să aibă deci o acţiune citotoxică slabă şi nespecifică imunologic.

Date similare a adus şi studiul modificărilor morfologice, în sensul că alterări lizosomale importante, ireversibile, care să ducă la distrugerea celulei şi la liberarea enzimelor lizosomale extracelular, se constată numai în cazul macrofagelor histioide provenite de la animalul vaccinat B.C.G. şi puse în contact cu fracţiunile antigenice 1 (tuberculoproteina somatică) şi 2 (dializatul digestiei cu tripsină) (fig. 2, 3, 5 şi 6). Atît P.P.D. (fracţiunea 4), cît şi fracţiunea 3 (obţinută din extractul ulei-apă) induc alterări lizosomale minime, reversibile, care nu alterează vitalitatea celulei.

Aspectele morfologice confirmă şi vizualizează reacţia lizosomală a M.H. la diferiţii stimuli antigenici de origine micobacteriană, evidenţiată pe cale biochimică.

În contact cu componentele bacilare studiate, M.H. de la animalul normal manifestă o reactivitate lizosomală slabă, care nu afectează integritatea celulei şi care — aşa cum rezultă din determinările biochimice — nu pune în libertate, extracelular, enzimele lizosomale. Procese similare — evidenţiabile atît citochimic cît şi enzimatic — au loc şi în cazul acţiunii fracţiunilor 3 şi 4 asupra M.H. de la animalul vaccinat B.C.G., care de asemenea nu liberează extracelular o cantitate importantă de enzimă şi nici nu provoacă alterări morfologice ireversibile.

În cazul contactului cu fracţiunile 2 şi 3, M.H. de la animalul imunizat cu B.C.G. manifestă însă atît o alterare morfologică masivă, ireversibilă, cît şi liberarea extracelulară a enzimelor lizosomale evidenţiabilă prin prezenţa activităţii fosfatazice acide în mediul extracelular.

În ceea ce priveşte mecanismul de acţiune al acestor fracţiuni, este evident caracterul de răspuns specific imunologic al macrofagului, deoarece reactivitatea lizosomală masivă are loc numai în cazul M.H. de la animalul în prealabil imunizat cu micobacterii. Este însă dificil de precizat, în stadiul actual al cercetărilor, dacă această reactivitate de M.H. „imun" ţine de starea de hipersensibilitate celulară, indusă de infecţia cu B.C.G., sau dacă are la bază numai procesele de rezistenţă specifică, dobîndită prin vaccinare. Faptul că fracţiunea P.P.D., a cărei proprietate de a declanşa fenomenele de hipersensibilitate celulară este

Fig. 1. — Macrofage histioide, din cavitatea peritoneală a cobaiului normal, cultivate pe lamele de sticlă, în monostrat, şi puse în contact (2 ore la 37°C) cu P.P.D. Colorare intravitală cu acridin-oranj (1 300—3 600 ×). Se observă fluorescenţă intensă a lizosomilor şi agregatelor de lizosomi, dispuse la periferia citoplasmei (pinocitoză).

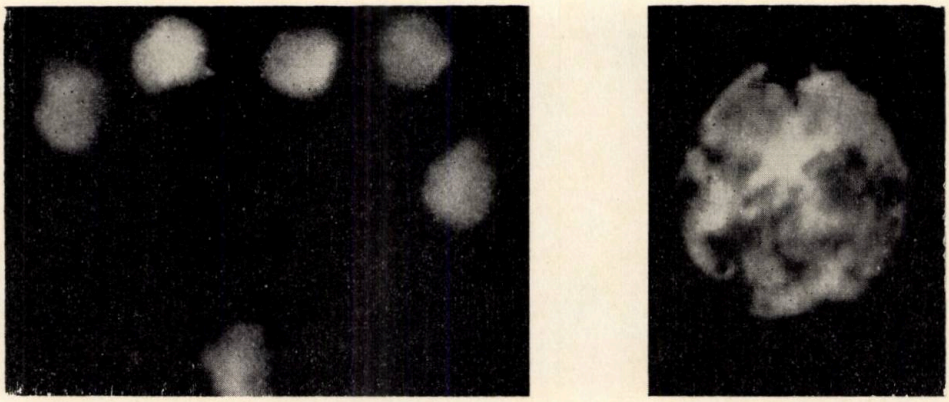


Fig. 2. — Macrofage histioide din cavitatea peritoneală a cobaiului vaccinat cu B.C.G., cultivate în monostrat şi puse în contact cu fracţiunea *2* (dializatul digestiei triptice de bacili delipidaţi). Colorare intravitală cu acridin-oranj (1 000 şi 3 600 ×). Se observă fluorescenţa intensă a celei mai mari părţi din citoplasmă.

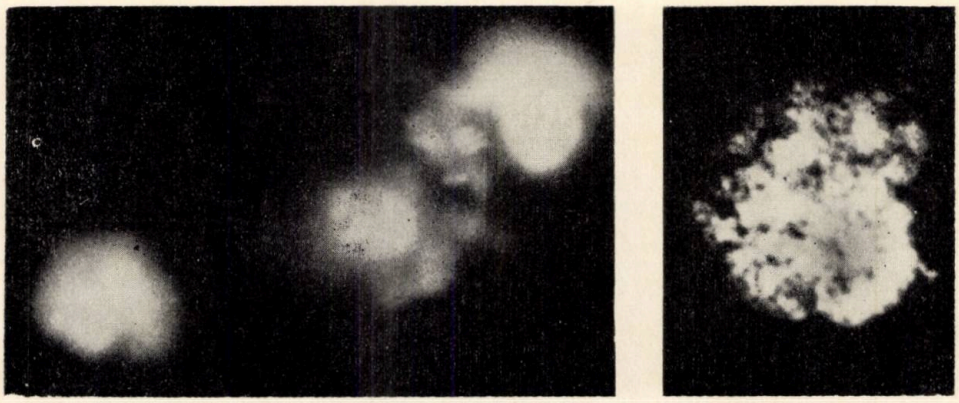


Fig. 3. — Macrofage histioide peritoneale de la cobaiul vaccinat B.C.G., cultivate în monostrat şi puse în contact cu fracţiunea *1* (tuberculoproteina somatică). Colorare intravitală cu acridin-oranj (1 000 şi 3 600 ×). Se observă celule cu fluorescenţă intensă, uniformă, alături de celule degradate, cu fluorescenţă lizosomală restantă.

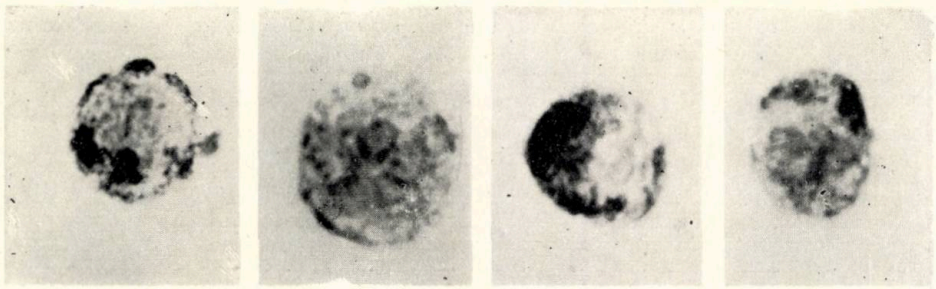


Fig. 4. — Reacţie citochimică pentru fosfataza acidă la macrofagul histioid de la cobaiul normal, în contact cu P.P.D. Se observă aglomerarea de particule lizosomale la periferia citoplasmei, indicînd preluarea pe cale pinocitară a hapteinei tuberculinice purificată.

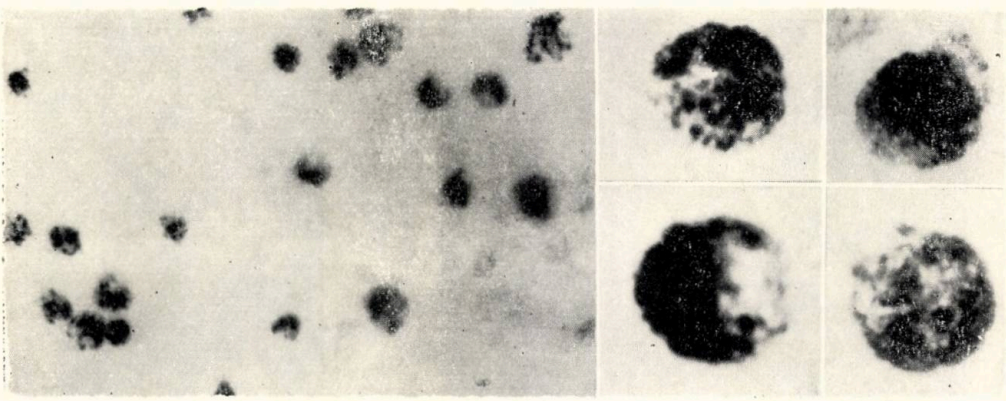


Fig. 5. — Reacţie citochimică pentru fosfataza acidă la macrofagul histioid de la cobaiul vaccinat B.C.G., în contact cu tuberculoproteina somatică (fracţiunea *1*). Stadiu de reactivitate izosomală avansat, în care cea mai mare parte a ariei citoplasmatice apare intens colorată (citosomi).

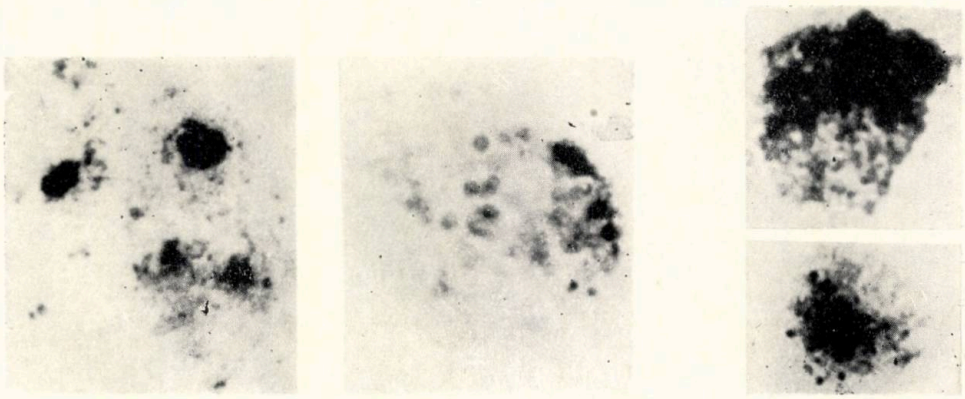


Fig. 6. — Reacţie citochimică pentru fosfataza acidă la macrofagul histioid de la cobaiul vaccinat B.C.G., în contact cu dializatul digestiei triptice a corpilor bacilari delipidaţi (fracţiunea *2*). Se observă degradarea avansată a structurii interne celulare, reacţia lizosomală fiind vizibilă într-o zonă de detritusuri celulare.

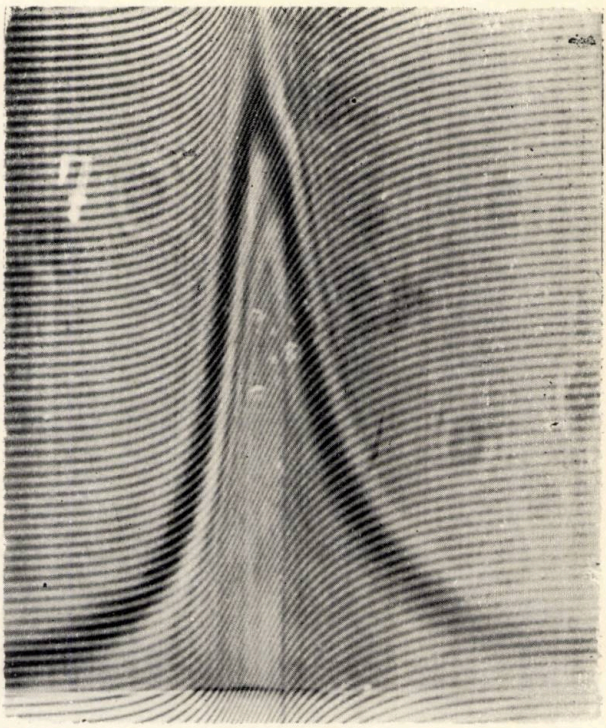


Fig. 7. — Aspectul electroforetic al tuberculoproteinei somatice (fracţiunea *1*); se remarcă prezenţa unei singure componente, omogenă (microelectroforeză tip Tiselius, în coloană de lichid, cu aparatul Electrophoresegerät E-35, C. Zeiss, Jena).

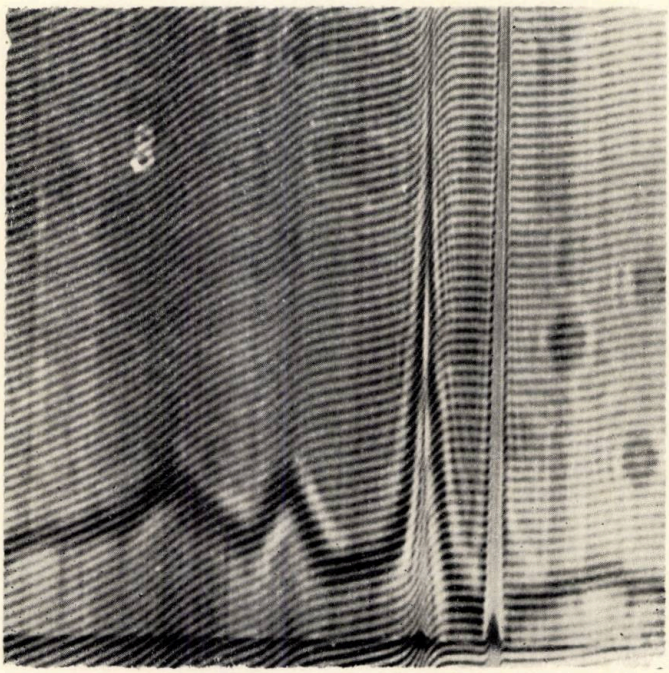


Fig. 8. — Aspectul electroforetic al dializatului digeratului cu tripsină al corpilor bacilari delipidaţi (fracţiunea *2*). Se observă prezenţa unui număr de cel puţin 8 subfracţiuni, separabile prin migrarea în cîmp electric.

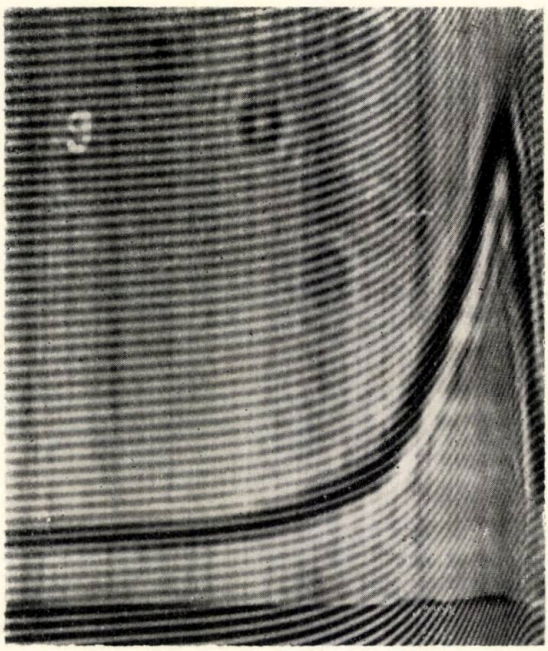


Fig. 9. — Aspectul electroforetic al fracțiunii *3* (precipitată cu acetonă din supernatantul de 13—15 000 *g* al extrasului cu ulei-apă din corpii bacilari delipidați). Se observă prezența unui singur vîrf electroforetic, care migrează deosebit de lent în cîmpul electric.

binecunoscută [11] nu poate provoca o reacţie lizosomală masivă în cazul M.H. „imun", ar pleda împotriva implicării în acest proces a unor mecanisme de hipersensibilitate. Pe de altă parte însă, studii recente [12] au demonstrat că în procesele de hipersensibilitate celulară partea proteică a antigenului constituie un factor de specificitate cel puţin la fel de important ca şi partea haptenică. Or, cum în cazul antigenului tuberculinic fracţiunea P.P.D. are numai calităţi haptenice, iar tuberculoproteina somatică experimentată de noi are proprietăţile antigenului complet şi se dovedeşte capabilă să provoace reacţii lizosomale importante, rezultă că substratul de hipersensibilitate al acestor reacţii nu poate fi exclus fără rezerve. De aceste date, precum şi de faptul că reacţii lizosomale la M.H. „imun" poate declanşa şi o componentă ca fracţiunea 2, capabilă să vaccineze animalul fără să provoace şi starea de sensibilitate tuberculinică, urmează să se ţină seama în studii ulterioare, care vor căuta să adîncească fenomenul şi mecanismele reacţiei lizosomale faţă de antigene micobacteriene.

Prezentată la redacţie
la 16 martie 1966

Sectorul de biochimie şi fiziologie bacteriană, Institutul clinic de ftiziologie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. C. De Duve, *Lysosomes : a new group of cytoplasmic particles*, în *Subcellular particles*, sub redacţia T. Hayashi, Ronald Press Co., New York, 1959, p. 128.
2. Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, *The isolation and properties of the specific granules of rabbit polymorphonuclear leukocytes*, J. exp. Med., **112**, 983 (1960).
3. Z. A. Cohn, E. Wiener, *The particulate hydrolases of macrophages. II. Biochemical and morphological response to particle ingestion*, J. exp. Med., **118**, 1009 (1963).
4. Z. A. Cohn, B. Benson, *The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. II. The influence of serum on granule formation, hydrolase production, and pinocytosis*, J. exp. Med., **121**, 835 (1965).
5. M. B. Lurie, *Resistance to tuberculosis. Experimental studies in native and acquired defensive mechanisms*, Harvard Univ. Press, Cambridge, Massach., 1964.
6. Eug. Păunesco, E. Ilica-Hadirca, *Réactivité biochimique et immunologique du macrophage histoïde en tuberculose. III. Activité phosphoestérasique*, Rev. roum. Biochim., **3**, 259 (1965).
7. Eug. Păunescu, *Reactivitatea biochimică şi imunologică a macrofagului histioid în tuberculoză. IV. Efectul serului hiperimun asupra interacţiunii dintre bacilul tuberculozei şi macrofagul histioid de la animalul normal şi vaccinat B.C.G.*, Microbiol., epidemiol., parazitol., *5* (1967).
8. A. C. Allison, L. Mallucci, *Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus-infected cell cultures*, J. exp. Med., **121**, 463 şi 477 (1965).
9. Eug. Păunesco, E. Hadirca, *Réactivité biochimique et immunologique du macrophage histioïde en tuberculose. I. Activité déhydrogénasique et phosphatasique*, Rev. roum. Biochim., **1**, 183 (1964).
10. K. Saito, E. Suter, *Lysosomal acid hydrolases in mice infected with BCG*, J. exp. Med., **121**, 727 (1965).
11. S. Raffel, *Immunity, hypersensitivity and serology*, Appleton-Century-Crofts Inc., New York, 1953.
12. B. Benacerraf, *Immediate and delayed allergy. Differences between both*, Report at V-th International Congress of Allergology, Madrid, 1964.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 3, 287–291 (1967)

BIOCHIMIA COMPARATĂ A PROTEINELOR CEREBRALE

MIHAIL ŞERBAN

577.11

Rezumat. — Se expun concluziile cercetărilor originale efectuate în domeniul proteinelor cerebrale solubile în filogenie. Aceste concluzii sînt prezentate şi interpretate de pe poziţia biochimiei comparate. Se subliniază contribuţiile aduse la conturarea capitolului de biochimie comparată a proteinelor cerebrale, precum şi perspectivele cercetărilor în această direcţie.

Stadiul, importanţa şi perspectivele cercetărilor referitoare la proteinele cerebrale au fost subliniate şi justificate recent de către noi [1]. În acest context, considerăm că una din căile majore pentru abordarea cercetării proteinelor din creier o constituie biochimia comparată. Această ramură s-a impus cu autoritate — atît ca concepţie, cît şi ca linie metodologică de investigaţie — în numeroase cercetări moderne de biochimie.

Studiul proteinelor cerebrale de pe această poziţie poate contribui la cunoaşterea mai aprofundată a naturii, însuşirilor şi metabolismului lor, în esenţă la conturarea rolului lor în activitatea cerebrală, ca reflectare a evoluţiei filogenetice. Cercetările de biochimie comparată a proteinelor din creier ar putea permite totodată şi precizarea unor aspecte legate de organizarea planului biochimic al creierului, de stabilirea bazelor moleculare ale evoluţiei acestui organ.

Primele cercetări sistematice de biochimie comparată a proteinelor solubile din creier în filogenie au fost iniţiate, cu cîţiva ani în urmă, în cadrul Institutului de biochimie [2 — 8] pe baza următoarelor premise : vertebratele se caracterizează printr-un sistem nervos central bine diferenţiat, iar evoluţia reflectă într-o măsură adecvată particularităţile funcţionale, structurale şi biochimice ale acestuia ; deşi rolul substanţelor proteice în activitatea nervoasă nu este suficient de conturat, era de presupus totuşi ca proteinele din creier să prezinte anumite caracteristici în funcţie de evoluţia filogenetică, respectiv de complexitatea funcţională a creierului.

Ca o primă etapă necesară, investigaţiile întreprinse de către noi pînă în prezent au urmărit : *a*) stabilirea relaţiilor dintre proteinele cerebrale solubile şi gradul de evoluţie al creierului pe plan filogenetic ; *b*) caracterizarea acestor proteine prin precizarea unor aspecte referitoare la natura şi proprietăţile lor fizico-chimice. Cercetările personale efectuate în domeniul biochimiei comparate a proteinelor solubile din creier în filogenie au condus la conturarea unui ansamblu de concluzii, pe care le prezentăm în această lucrare de sinteză.

Proteinele cerebrale solubile se caracterizează printr-un mare grad de eterogenitate, reflectat într-un număr mare de tipuri de proteine componente. În funcţie de evoluţia filogenetică a creierului (peşte, amfibie, rep-

tilă, pasăre, mamifer), proteinele cerebrale solubile prezintă o diferențiere de natură calitativă, specifică, ce se traduce printr-o creștere a numărului de tipuri de proteină. Aceste modificări calitative se evidențiază atît la nivelul tipurilor de proteine corespunzătoare (după criteriul mobilității în cîmp electric) „albuminei", cît și la nivelul „globulinelor". În acest sens considerăm ca semnificativă existența unor fracțiuni „prealbuminice", specifice proteinelor solubile din creierul vertebratelor mai evoluate pe plan filogenetic. În componența proteinelor solubile din creier se remarcă predominanța fracțiunilor de natură globulinică indiferent de gradul de evoluție filogenetică. Sub raport comparativ, fracțiunile corespunzătoare „albuminelor" apar în cantitatea cea mai mică (aproximativ 10%). Rezultatele analizelor electroforetice și prelucrarea lor au indicat că tipurile de proteine cerebrale care prezintă din punct de vedere cantitativ valoarea cea mai ridicată sînt localizate în regiunea *beta*-globulinelor, unde este, de fapt, și zona de acumulare a lipoproteidelor. Aceasta constituie o altă caracteristică a proteinelor solubile din creier în filogenie.

Cercetările efectuate au dovedit, că proteinele cerebrale reprezintă componente complexe: glico- și lipoproteice. S-a constatat că glicoproteinele cerebrale — neutre și acide — manifestă un grad de eterogenitate diferit în filogenia creierului; aceste componente sînt localizate pe toate tipurile de proteine cerebrale corespunzătoare fiecărei trepte de evoluție filogenetică. Din contră, lipoproteidele cerebrale sînt complexe mai omogene, manifestînd o comportare în cîmp electric în general identică pentru diferitele trepte de evoluție filogenetică.

Dar, pe lîngă aspectele generale menționate care definesc diferențierea proteinelor cerebrale în filogenie, aceste proteine prezintă și o serie de trăsături asemănătoare.

Astfel, cercetările întreprinse în legătură cu fracționarea chimică a proteinelor solubile din creier au evidențiat faptul că diferitele tipuri de proteine prezintă caractere de solubilitate apropiate, ceea ce reflectă într-un anumit grad „configurația" lor superficială. Această comportare a confirmat ipoteza noastră de lucru după care, în procesul de salifiere și desalifiere, diferitele tipuri de proteine cerebrale ar putea să manifeste unele particularități dependente de „configurația" superficială a moleculelor respective și care s-ar reflecta în caracterul lor de solubilitate. După proprietățile de solubilitate manifestate, s-a conchis că majoritatea tipurilor de proteine cerebrale prezintă în filogenie o proporție, respectiv o repartiție destul de asemănătoare a grupărilor polare hidrofile. Pe baza criteriului solubilității, al comportării la fracționarea chimică prin săruri, s-a semnalat că anumite tipuri de proteine din creier, denumite arbitrar „albumine" sau „globuline" prin analogie cu ordinul de mobilitate electroforetică al fracțiunilor serice, nu pot fi încadrate riguros în aceste categorii. Printre proteinele cerebrale solubile, s-a pus în evidență existența a două tipuri caracterizate printr-o solubilitate salină mare, precum și prin discordanța dintre această solubilitate, care le conferă o anumită apartenență (tip albumie), și sarcina lor electrică care le conferă o altă apartenență (tip globuline).

Proteinele cerebrale solubile se fracționează chimic în patru fracțiuni principale, care se deosebesc prin compoziția și proprietățile lor fizico-chimice. Astfel, la concentrații saline mai mici se fracționează

unele componente cu caracter glico-lipoproteic, precum şi complexele lipoproteice; tipurile de proteine care determină prin numărul lor eterogenitatea proteinelor din creier în filogenie, respectiv complexele glicoproteice, se fracţionează la concentraţii saline mai mari, posedînd deci solubilităţi saline mai mari.

Aspectele menţionate referitoare la comportarea proteinelor cerebrale solubile în procesul fracţionării chimice prin săruri se regăsesc la întreaga scară filogenetică a creierului. Rezultă aşadar că aceste proteine prezintă în filogenie şi o trăsătură comună.

Investigaţiile noastre s-au adresat şi altor proprietăţi ale moleculelor proteice. Astfel, din punct de vedere polarografic, proteinele cerebrale solubile se caracterizează printr-o serie de indici care — după valoarea lor — pot fi consideraţi drept constante în scara filogenetică a creierului. Aceste proteine manifestă în filogenie o comportare similară, demonstrată prin activitatea lor interfacială şi prin activitatea catalitică a grupărilor tiolice (respectiv disulfhidrice electroreductibile) ale proteinelor nedenaturate, denaturate chimic sau hidrolizate enzimatic. Cercetările polarografice întreprinse în diferite variante experimentale au adus date noi cu privire la natura proteinelor cerebrale solubile, stabilindu-se că în componenţa acestora, indiferent de gradul de evoluţie filogenetică, intră cu predominanţă tipuri de proteine practic de aceeaşi natură. Într-adevăr, comportarea, caracterele şi proprietăţile lor polarografice au dovedit că marea majoritate a acestor tipuri de proteine sînt de natură globulinică, ceea ce a confirmat ipoteza noastră anterioară. Sub raport comparativ, se constată că din punct de vedere polarografic proteinele cerebrale manifestă un paralelism marcant cu proteinele serice normale de natură globulinică. Ceva mai mult, şi „filtratele" proteinelor solubile din creier prezintă în filogenie o activitate similară. Compuşii sulfosalicil-solubili ai acestor proteine sînt, în general, de natură mucoprotidică, asemănători cu cei identificaţi — în aceleaşi condiţii — în cazul proteinelor serice normale.

În fine pe baza cercetării corelaţiei dintre proteinele cerebrale solubile şi aminoacizii liberi din creier în filogenie, s-a stabilit că, independent de gradul de evoluţie, compoziţia creierului se caracterizează printr-un număr mare de aminoacizi liberi, punîndu-se în evidenţă practic majoritatea aminoacizilor cunoscuţi. S-a precizat astfel că conţinutul creierului în aminoacizi liberi prezintă în filogenie o mare asemănare, ceea ce subliniază trăsătura comună, unitatea acestei compoziţii. De asemenea, concentraţia aminoacizilor liberi din creier în filogenie este foarte apropiată; această caracteristică constituie o altă trăsătură comună, pe care aceşti compuşi o manifestă în filogenia creierului. Dar unitatea de compoziţie menţionată se evidenţiază şi prin existenţa unor compuşi semnificativi în filogenie, anume, în primul rînd, acidul glutamic şi acidul *gamma*-aminobutiric, apoi glutamina şi glutationul. Acesta din urmă apare ca un component semnificativ din punct de vedere cantitativ, mai ales în creierul vertebratelor cu sînge rece. Aminoacizii liberi din creierul mai evoluat filogenetic (păsări, mamifere) manifestă o activitate polarografică specifică grupării tiol (respectiv grupării disulfhidrice după electroreducerea sa prealabilă); la vertebratele cu sînge rece, această activitate este atenuată sau modificată de prezenţa în concentraţie mai mare a

glutationului. S-a demonstrat că, spre deosebire de alți aminoacizi sau amestecuri de aminoacizi, glutationul modifică aspectul undei polarografice a grupării tiol, cu care interferează.

Așadar, aminoacizii liberi din creier manifestă în scara vertebratelor o trăsătură generală comună (compoziție, concentrație, aminoacizi semnificativi), în cadrul căreia apar și anumite particularități (prezența și conținutul în grupări polaroactive) dependente de gradul de evoluție filogenetică a creierului.

Din generalizarea datelor obținute în cercetările de biochimie comparată efectuate se conturează ideea fundamentală că proteinele solubile din creier prezintă în filogenie o diversitate și, în același timp, o unitate. Diversitatea se manifestă prin grade de eterogenitate diferite, precum și prin unele caracteristici în care se reflectă diferențierea calitativă a acestor proteine, determinată de evoluția creierului pe plan filogenetic. Paralel cu aceasta, unitatea proteinelor cerebrale în filogenie apare evidentă prin existența unor proprietăți comune și a unor asemănări de comportare a lor (inclusiv aminoacizii liberi) și care au fost sintetizate în unele din concluziile mai sus menționate. Dacă diversitatea proteinelor cerebrale solubile este condiționată de activitatea funcțională, respectiv de structura morfologică a creierului, ca expresie a evoluției filogenetice, unitatea lor, în schimb, este determinată de natura asemănătoare, de existența unei filiații a unui fond comun al proteinelor cerebrale în filogenie, care se manifestă prin identitatea unui ansamblu de proprietăți. În investigarea comparativă și corelativă a proceselor biochimice, evidențierea caracterelor de unitate, în cadrul diferitelor stadii evolutive ale materiei vii poate prezenta o semnificație deosebită pentru înțelegerea și explicarea manifestărilor funcționale complexe, ca rezultat al evoluției.

Considerăm că materialul original referitor la proteinele cerebrale publicat de către noi anterior și sintetizat sub forma concluziilor prezentate aici, constituie totodată și un anumit aport la conturarea unui capitol nou al biochimiei evolutive, biochimia comparată a proteinelor cerebrale, domeniu căruia i se acordă astăzi un interes crescînd.

Ca perspective, dezvoltarea cercetărilor de biochimie comparată, a proteinelor cerebrale ar putea arunca o lumină nouă asupra legăturii generale dintre aceste proteine și activitatea funcțională, tot mai complexă a creierului, o dată cu dezvoltarea sa filogenetică. Abordarea și aprofundarea unor cercetări referitoare la stabilirea tipurilor de proteine prezente și a naturii lor în funcție de topografia anatomică a creierului în filogenie, la precizarea relațiilor dintre aceste tipuri de proteine și diferite stări de activitate funcțională a creierului, precum și la stabilirea unor aspecte ale metabolismului proteinelor din creier în filogenie, ar putea contribui într-o măsură corespunzătoare la înțelegerea rolului lor biochimic și funcțional. Aplicarea cercetărilor de biochimie comparată la studiul proteinelor cerebrale, precum și al altor componente ale creierului constituie o premisă pentru cunoașterea mai aprofundată a biochimiei funcționale a materiei vii, ajunsă la cel mai înalt grad de organizare.

Prezentat la redacție
la 8 noiembrie 1966

Institutul de biochimie
al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. M. Şerban, *Proteinele cerebrale*, St. cerc. biochim., **10**, 69 (1967).
2. M. Şerban, *Cercetarea electroforetică a proteinelor solubile din creier în filogenie*, St. cerc. biochim, **3**, 309 (1959).
3. M. Şerban, *Comportarea proteinelor cerebrale acvosolubile în procesul de salifiere şi desalifiere*, St. cerc. biochim., **5**, 103 (1961).
4. M. Şerban, *Studies of the brain water soluble proteins in phylogeny*, IVth Int. Cong. Biochem., Moscow, **6**, 150 (1951).
5. M. Şerban, *Filogenia proteinelor cerebrale şi fracţionarea lor chimică*, St. cerc. biochim., **7**, 383 (1963).
6. M. Şerban, *Polarografia proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie*, Rev. roum. Biochim., **2**, 217 (1964).
7. M. Şerban, *Aminoacizii liberi din creier în filogenie*, Rev. roum. Biochim., **3**, 335 (1964).
8. M. Şerban, *Cercetări în domeniul proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie*, Teză de doctorat, Bucureşti, 1963, 236 p.

G. A. OVERBEEK, *Anabole Steroide, Chemie und Pharmakologie* (Steroizi anabolizanţi, chimie şi farmacologie), Editura Springer, Berlin, Heidelberg şi New York, 1966, 80 p.

Bazat pe o bogată experienţă personală şi pe un vast material bibliografic, autorul sintetizează în această monografie numeroasele date experimentale dintr-un domeniu atît de important cum este cel al steroizilor anabolizanţi.

În capitolul introductiv, autorul dă mai întîi definiţia noţiunii de „steroid" şi „anabolizant" şi arată importanţa alegerii unor metode de cercetare adecvate scopurilor urmărite.

Capitolul al doilea, „Steroizii anabolizanţi şi metabolismul proteic", cuprinde un studiu critic al efectelor obţinute la nivelul diferitelor organe şi ţesuturi ale organismului uman şi animal, sub influenţa unei serii de steroizi anabolizanţi naturali şi sintetici. Metodele folosite în cercetarea steroizilor anabolizanţi şi condiţiile pe care ele trebuie să le îndeplinească pentru a putea fi folosite cu succes pe scară largă în practică fac obiectul capitolului al treilea. Ultimul capitol este dedicat descrierii celor mai importanţi reprezentanţi ai steroizilor anabolizanţi, caracterizaţi printr-o activitate anabolică ridicată şi efecte secundare reduse şi care fac parte din grupa androstanului, estranului şi pregnanului.

Pe lîngă o bibliografie bogată şi un index alfabetic pe subiecte, monografia cuprinde şi două anexe utile pentru cercetătorii care lucrează în acest domeniu. Prima conţine lista tuturor steroizilor cu activitate anabolizantă găsiţi de autor în literatura de specialitate. Produşi sînt grupaţi în trei grupe (grupa derivaţilor de androstan, a derivaţilor de estran şi a celor de pregnan) şi sînt înşiruiţi în ordine alfabetică. Anexa a doua cuprinde o tabelă în care sînt trecute preparatele anabolizante, cu denumirea lor ştiinţifică şi comercială, formula lor structurală, ţara şi firma producătoare.

Materialul expus de G. A. Overbeek în această monografie prezintă interes pentru biochimişti, fiziologi, endocrinologi, farmacologi şi medici.

Horst D. Schell
cercetător principal
la Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

Prof. dr. H. A. SCHWEIGART, în colaborare cu prof., dr. F. Koelsch, dr. Dr. H. Schwarz dr. F. Krück, prof. dr. H. A. Schweigart dr. R. — U. Psiorz-Stanjek, *Getränke mit besonderer Berücksichtigung der Hitzegetränke sowie des Bohnenkafees* (Băuturi cu referire specială la băuturile de compensare, administrate în condiţii speciale de temperatură ridicată, precum şi la cafeaua naturală), volumul II din seria publicaţiilor Societăţii internaţionale pentru cercetarea produselor alimentare şi vitale, Editura Hans Zauner, München, 1965.

După o scurtă introducere, semnată de H. A. Schweigart, referitoare la rolul covîrşitor al apei în procesele metabolice din organismele vii, la repartiţia şi mişcarea lichidelor din organismul uman şi la pierderile considerabile de apă şi substanţe minerale ce pot avea loc în urma transpiraţiilor intense de la locurile de muncă cu temperaturi ridicate (4—8 litri de sudoare

într-un schimb), se dau mai întîi cîteva recomandări importante, elaborate de Consiliul ştiinţific al Societăţii internaţionale pentru cercetarea produselor alimentare şi vitale, cu privire la băuturile de compensare adecvate pentru a fi administrate în aceste condiţii de lucru.

Problema băuturilor de compensare şi a băuturilor în general, pentru diferitele categorii de muncitori care lucrează în condiţii de temperatură ridicată sau în mediu toxic, este reluată şi tratată mai amănunţit, de F. Koelsch, în primul articol intitulat „Băuturi pentru muncitorii care lucrează în condiţii de temperatură ridicată sau în mediu toxic; aprovizionarea cu băuturi în întreprinderi".

Articolul al doilea, „Tipul şi nevoia de băutură în minele de cărbuni cu temperaturi ridicate", semnat de H. G. Schwarz, cuprinde o analiză critică a diferitelor tipuri de băuturi ce se administrează muncitorilor supuşi temperaturilor înalte la locurile lor de muncă. Autorul arata că tipul băuturii şi nevoia de băutură depind de obicei de faptul dacă temperatura ridicată de la locul de muncă se datoreşte căldurii de contact din atmosfera înconjurătoare, cum este cazul, de pildă, în minele de cărbuni, sau dacă ea derivă, de exemplu, din căldura radiantă a masei incandescente a furnalelor. În primul caz, temperatura ridicată rămînînd cam aceeaşi în cursul unui schimb, nevoia de băutură este de obicei mai mare şi băutura necesită o altă compoziţie de cît în cazul acţiunii unei călduri radiante care se manifestă numai cu intermitenţă şi permite şi pauze pentru răcorire. Astfel, în timp ce pentru muncitorii expuşi căldurii de contact se recomandă cu succes diferite ceaiuri negre, amestecate poate şi cu ceaiuri din plante medicinale, pentru cei expuşi căldurii radiante se recomandă şi sucuri de fructe cu diferite adaosuri speciale, ca vitamine, substanţe minerale etc.

„Cu privire la fiziologia setei" este titlul articolului următor, scris de F. Krück. După cîteva consideraţii generale despre importanţa apei ca principiu fundamental pentru toate procesele vitale, autorul expune diferitele concepţii cu privire la naşterea şi importanţa senzaţiei de sete, elaborate în ultimele două secole, inclusiv cea valabilă şi astăzi despre reglarea osmotică a eliberării hormonului antidiuretic. Cu evaluarea setei ca simptom al unor stări patologice se încheie acest interesant articol.

Un articol mai amplu, cu 20 de scheme, tabele şi figuri şi 14 indicaţii bibliografice, prezentat de H. A. Schweigart, este consacrat remineralizării organismului prin băuturi de compensare. Autorul expune la început, schematic, perturbările mai importante ale regimului hidric şi al electroliţilor, indicînd apoi diferitele cauze care duc la instalarea acidozei şi alcalozei, arată în continuare importanţa sodiului şi potasiului pentru organism şi necesitatea compensării pierderilor datorite transpiraţiilor abundente, ajungînd la concluzia că băutura indigenilor din Africa de Sud, numită magou, ar fi una din cele mai adecvate băuturi de compensare, fiind compusă din apă minerală îmbogăţită în electroliţi şi ceaiuri din plante speciale. Tabele cu componentele organice şi anorganice ale transpiraţiei, precum şi cu necesarul în macro- şi microelemente pentru un adult, completează materialul expus.

Ultimul articol intitulat, „Cu privire la acţiunea cafelei naturale", reprezintă un studiu bazat pe date din literatură (120 de indicaţii bibliografice), în care autoarea R. -U. Psiorz-Stanjek încearcă să clasifice datele, deseori contradictorii, cu privire la acţiunea fiziologică a cafelei naturale, al cărei consum este în continuă creştere. Problemele atinse sînt deosebit de variate şi cuprind aspecte legate atît de componentele active ale cafelei, cît şi de acţiunea acestora asupra celor mai diferite organe şi centri ai organismului.

Seria articolelor cuprinse în această publicaţie este însoţită de rezumate în limba engleză şi franceză şi interesează în aceeaşi măsură atît pe biochimişti, şi fiziologi, cît şi pe medici şi pe toţi cei care se ocupă de problemele legate de protecţia muncii.

Horst D. Schell
cercetător principal
la Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

Prof. Dr. H. A. SCHWEIGART, *Butter und Margarine, eine wissenschaftliche Studie* (Untul şi margarina, un studiu ştiinţific), volumul III din seria publicaţiilor Societăţii internaţionale pentru cercetarea produselor alimentare şi vitale, Editura Georg Pinkvoss, Hannover, 1966.

Într-un limbaj clar şi într-o formă deosebit de concisă, autorul expune şi analizează în cele 72 de pagini ale studiului său cele mai variate aspecte tehnologice, biochimice, medicale şi economice legate de unt şi margarină ca factori alimentari. Scopul acestui studiu nu este de a lua apărarea untului sau a margarinei în disputa vehementă care s-a încins, mai ales în ultimii ani, pe plan mondial, pentru prioritatea unuia sau altuia, ci de a analiza importanţa acestor două produse pentru alimentaţia omului.

După ce în primul capitol se dă definiţia şi compoziţia untului şi a margarinei, procesul tehnologic al obţinerii lor, precum şi teoria formării untului, în capitolul al doilea se arată caracteristicile diferitelor grăsimi, insistîndu-se mai ales asupra celor alimentare. Dintre acestea, un loc important îl ocupă untul şi margarina. Astfel, pe lîngă vitamine şi alte principii alimentare, untul conţine aproape 80 de acizi graşi, saturaţi şi nesaturaţi.

În capitolul al treilea, autorul trece în revistă concepţii mai vechi clasice, şi concepţii mai noi cu privire la formele şi căile de resorbţie a grăsimilor alimentare, precum şi transportul şi asimilarea acestora. Sînt prezentate, între altele, cele două cicluri ale colesterolului în transportul grăsimilor, apoi ultimele date experimentale obţinute în cercetările legate de resorbţia grăsimii din lapte, procesele enzimatice legate de metabolismul grăsimilor, schema degradării şi biosintezei grăsimilor în celule (ciclul lui Knoop şi Lynen) şi cîteva consideraţii cu privire la grăsimea ca sursă de energie a organismului. Ţinînd cont de toate acestea, autorul arată că metabolismul lipidic trebuie privit întotdeauna legat de cel general şi că fenomenul de arterioscleroză nu reprezintă nicidecum numai o problemă legată de grăsimi.

În capitolul al patrulea sînt discutate probleme fiziologice legate de acizii graşi. Autorul analizează critic regimul alimentar propus de A. şi M. Keys şi indică necesarul teoretic de grăsimi pentru om.

Capitolul al cincilea este dedicat alimentaţiei, ateromatozei şi infarctului cardiac. O schemă deosebit de sugestivă arată multitudinea de factori care duc la infarct.

Relaţiile care există între alimentaţie, consumul de grăsimi, colesterolul, ateromatoză, aterosclerozâ, arterioscleroză şi infarctul cardiac — cărora numai între anii 1959 şi 1962 le-au fost consacrate aproape 10 000 de lucrări — au format în 1965 obiectul unui studiu al Societăţii internaţionale pentru cercetarea produselor alimentare şi vitale, concretizat într-o hotărîre luată de Conventul internaţional pentru produse vitale, alimentaţie şi bolile de civilizaţie. Amănunte cu privire la această hotărîre şi comentarea ei fac obiectul capitolului al şaselea.

Ultimul capitol cuprinde o situaţie statistică asupra consumului de grăsimi în diferite regiuni ale globului şi ale R. F. a Germaniei în ultimii 20 de ani.

Din materialele expuse în această lucrare rezultă că pentru o alimentaţie justă, pe lîngă uleiurile de diferite origini, un rol important îl ocupă atît untul, cît şi margarina, şi nu este justificată disputa dintre adepţii untului şi cei ai margarinei.

Lucrarea cuprinde 128 de indicaţii bibliografice, este ilustrată cu 34 de tabele, figuri şi scheme instructive şi posedă pe lîngă tabla de materii şi un index alfabetic pe subiecte, care uşurează mult găsirea diferitelor probleme tratate în text.

Horst D. Scheel

cercetător principal
la Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

PROCEEDINGS OF THE FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR CELLULAR CHEMISTRY, „INTRACELLULAR MEMBRANEOUS STRUCTURE", *Ohtsu-Japonia*, 27—31 martie 1963, editor: Japan Society for cell biology, 1966

Sub îngrijirea lui S. Seno şi E. V. Cowdry au apărut, în 1966, într-un volum editat de Societatea japoneză de biologie celulară, lucrările primului simpozion internaţional de chimie celulară, cu tema „structura membranelor intracelulare". Volumul este dedicat regretatului profesor Seizo Katsunuma († 1963), care a prezidat lucrările acestui simpozion. Lucrările desfăşurîndu-se pe secţiuni, fiecărei secţiuni îi revine un capitol aparte al cărţii. S-a urmărit redarea exactă a desfăşurării lucrărilor prin prezentarea discuţiilor pe marginea fiecărei comunicări. În fiecare capitol se prezintă iniţial, de către un specialist cunoscut, „observaţii introductive", care fac un scurt istoric şi trec în revistă, rezumativ, ultimele cunoştinţe în domeniul respectiv.

Primul capitol, *Reticulul endoplasmatic*, de 70 de pagini, abordează această structură a celulei, pusă în evidenţă acum 10 ani de Palade şi studiată intens cu microscopul electronic. Comunicările prezentate (5) aduc serioase contribuţii la lămurirea structurii acestei formaţiuni în mai multe organe, cum sînt ficatul, pancreasul, retina, sau la viermii de mătase. Dintre ele se evidenţiază lucrarea lui D. W. Fawcett, „Variaţiile structurale şi funcţionale ale membranelor citoplasmatice", care prin metode histochimice deosebit de elegante contestă teoria „unit membrane" a lui Robertson, teorie care are la bază demonstrarea unei continuităţi între membranele învelişului nuclear, reticulul granular (*rough*), reticulul agranular (*smooth*) şi complexul lui Golgi şi descoperirea unei structuri unitare a membranelor citoplasmatice. Aceste fapte au condus la teoretizarea ideii că fiecare din aceste formaţiuni reprezintă o specializare strict locală a unei singure formaţiuni citoplasmatice, reticulul endoplasmatic. De aceea, autorului articolului îi revine un merit cu atît mai mare cu cît, bazat pe observarea deosebirilor ultrastructurale, chimice şi funcţionale dintre aceste sisteme de membrane citoplasmatice, reuşeşte să demonstreze existenţa lor ca entităţi separate.

Din capitolul al II-lea *Mitocondria şi structurile înrudite*, de 80 de pagini, se relevă comunicările prezentate de F. S. Sjöstrand şi de D. E. Green, care expun două puncte de vedere deosebite asupra ultrastructurii membranelor mitocondriale. Lucrarea lui Sjöstrand, „Structura moleculară a membranelor citoplasmatice şi mitocondriale", după o sinteză a lucrărilor personale anterioare, aduce în discuţie un nou model pentru structura moleculară a membranelor mitocondriale, bazat pe o structură globulară, similară cu cea a membranelor citoplasmatice granulare (*rough*). Lucrarea lui D. E. Green, A. Tzagoloff şi T. Oda, „Ultrastructura şi funcţia mitocondriei", este mai complexă, aducînd punctul de vedere al biochimistului. Datele studiului cu microscopul electronic (evidenţierea particulelor membranei exterioare şi a membranei interioare, a matrixului dintre criste, a fluidului din interiorul membranelor) sînt corelate cu datele obţinute prin metodele biochimice de separare şi determinare funcţională (evidenţierea particulei elementare, a particulei membranei interioare echivalentă cu complexul lanţului transferului de electroni, a proteinei contractile, a sistemului de translocare etc.).

Capitolul al III-lea se referă la *Aparatul Golgi şi membranele înrudite*. Acestei structuri celulare misterioase şi controversate, pusă în evidenţă încă din 1889, dar care încă nu a ajuns să fie cunoscută în întregime nici pînă astăzi, i s-a acordat cel mai mare spaţiu (100 de pagini — opt lucrări). Lucrările abordează această temă cu seriozitate şi competenţă, atît sub aspectul structurii, cît şi sub acela al funcţiei enzimatice sau secretorii a aparatului Golgi, pe un material foarte variat (pancreas, cilii protozoarelor, spermatozoizi, ficat, rinichi etc.). Rezultatele prezentate nu aduc însă o lumină nouă, ci confirmă unele date anterioare, după care granulele secretorii, acrosomii spermatozoizilor, lisomii şi corpii multiveziculari derivă din aparatul Golgi.

Capitolul al IV-lea, *Membrana nucleară şi interrelaţiile nucleo-citoplasmatice*, cuprinde şapte lucrări (50 de pagini), în majoritate axate pe studierea membranei nucleului, nu ca o entitate

separată, ci în conexiune cu modificările survenite celorlalte formațiuni intracelulare (mitocondrii, ribosomi, reticulul endoplasmic etc.) în diferite faze ale diviziunii celulare).

Capitolul al V-lea, *Membrana celulară și structurile înrudite*, cuprinde patru lucrări (100 de pagini) axate pe studiul modificărilor survenite diferitelor membrane celulare în cursul fagocitozei și pinocitozei. În cadrul acestui capitol este trecută și o amplă lucrare a lui J.D. Robertson, „problemele curente ale structurii și substructurii membranei unitare", cu 40 de fotografii de secțiuni la microscopul electronic și 22 de diagrame, care prezintă concepția autorului asupra structurii unitare a membranelor, bazată pe existența a două substructuri: fin granulară și globulară.

Capitolul al VI-lea, *Transportul prin membrane* (60 de pagini), începe cu „observațiile preliminare" ale lui H. S. Bennett, care face un reușit istoric al teoriilor din acest domeniu și prezintă, pe puncte, unele date morfologice de care trebuie să se țină seama pentru a înțelege transportul activ prin membrane. Dintre celelalte șase lucrări se remarcă aceea prezentată de H. S. Bennett, „Legătura între membranele mobile și permeabilitatea celulei și transportul activ".

Volumul se încheie cu un index de autori și unul de subiecte.

Dată fiind natura lucrărilor, a fost necesar să se prezinte peste 300 de fotografii luate la microscopul electronic; ținem să evidențiem calitatea excepțională a acestora și prezentarea grafică excelentă a întregii cărți.

Singura obiecție care se poate aduce este aceea că transcrierea lucrărilor simpozionului ar fi fost utilă și mai valoroasă dacă ar fi apărut mai curînd după încheierea lucrărilor, și nu abia după trei ani. Deoarece însă majoritatea comunicărilor sînt sinteze ample, cartea își păstrează valoarea și în aceste condiții.

Cecilia Motaș

Institutul de biochimie
al Academiei Republicii Socialiste România

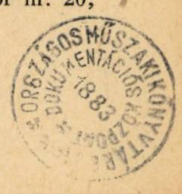
CONSTITUIREA COMISIEI DE BIOCHIMIE A ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

La 7 iulie 1966, prin hotărîrea Prezidiului Academiei Republicii Socialiste România, a fost înființată Comisia de Biochimie a Academiei.

Conform regulamentului de organizare și funcționare, acestei Comisii îi revine sarcina de a promova cercetările științifice fundamentale și aplicate în domeniul biochimiei, sprijinind aplicarea rezultatelor acestor cercetări în economia națională, de a organiza în țară manifestări științifice, comunicări și referate de specialitate, precum și de a ține legătura și de a colabora cu asociațiile și organizațiile similare din alte țări și internaționale.

Ședința de constituire a Comisiei de Biochimie a avut loc în 5 mai 1967. Prezidînd această ședință, acad. Șt. Milcu ,vicepreședinte al Academiei Republicii Socialiste România, a subliniat importanța aprecierii Comisiei și, totodată, a arătat că pentru înființarea unei asociații a biochimiștilor din țara noastră au militat în trecut atît acad. C. I. Parhon, cît și alți savanți români. În aceeași ședință, acad. E. Macovschi, președintele Comisiei de Biochimie a Academiei Republicii Socialiste România, a expus regulamentul de organizare și funcționare, precum și planul de muncă pe anul 1967 al Comisiei.

Comisia de Biochimie a Academiei Republicii Socialiste România are sediul în cadrul Institutului de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România (str. Docenților nr. 20, București 62, România).



„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc.; *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

LUCRĂRI APĂRUTE IN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25 × 17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25 × 17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50 × 21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 10, NR. 3, P. 187 — 298, BUCUREŞTI, IULIE 1967

I. P. „Informaţia" — c. 5125

43816

Lei 12.—

F1330

studii și cercetări de biochimie

4

TOMUL 10
1967

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 10, nr. 4, p. 299—388, București, noiembrie 1967

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 48 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134–135, Bucureşti, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

ADRESA REDACŢIEI:

Bucureşti, *Str. Docenţilor nr. 20,*
Raionul 30 Decembrie

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 10 (1967) Nr. 4

SUMAR

Pag.

V. ALEXANDRESCU, Comportarea electroforetică şi imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germeni şi endospermi de porumb 301

D. COTARIU, M. ŞERBAN, Fosfolipidele din muşchiul scheletic de broască în diferite stări funcţionale 307

C. FAIGHELIŞ, I. IANCU, C. COTRUTZ, M. PIEPTU, L. ABABEI, Modificări în activitatea glucozo-6-fosfat -NADP-oxidoreductazei în ficat şi în eritrocitele de şobolan cu epiteliom Guérin limfoid 313

A. GHEORGHIU, E. IONESCU-MATIU, F. PLATON, V. LUPULESCU, Cercetări asupra valorificării cornului de secară obţinut prin culturi în diferite regiuni ale ţării. Determinarea alcaloizilor totali, levogiri şi a ergotaminei 319

V. GHEŢIE, S. MIHĂESCU, L. BUZILĂ, Utilizarea cromatografiei de excludere moleculară la izolarea şi purificarea anticorpilor din precipitatele imune fluorescente 325

É. KÓTAY LAKATOS, E. KIFOR, O. KIFOR, Contribuţii la studiul fibrinogenului cu metoda polarografică în bolile reumatismale 333

H. D. SCHELL, Natura legăturilor în complecşii formaţi între proteine şi sărurile cuaternare de amoniu 337

C. ŞELARIU, Prezenţa transaminazei aspartice citoplasmatice în preparatele mitocondriale ale creierului de şobolan 341

F. TOCILESCU, O. MAMULEA, Consideraţii privind incidenţa fracţiunilor euglobulinice în pozitivarea testelor de disproteinemie (R. timol şi R. Jayle-Badin) 351

REFERATE GENERALE

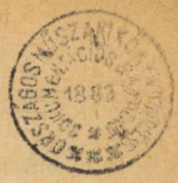
V. GHEŢIE, Organogeneza şi biosinteza proteinelor specifice la plantele superioare 357

M. KEREKES, Proteină nativă — proteină denaturată 369

RECENZII 381

St. cerc. biochimie, tomul 10, nr. 4, p. 299 — 388, Bucureşti, noiembrie 1967

ST. CERC.. BIOCHIM., 10, 4, 301–306 (1967)



COMPORTAREA ELECTROFORETICĂ ŞI IMUNOELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR SOLUBILE DIN GERMENI ŞI ENDOSPERMI DE PORUMB

VICTORIA ALEXANDRESCU

Rezumat. — Electroforeza în gel de agar a proteinelor solubile din germeni pune în evidenţă 14 fracţiuni proteice, şi anume 7 repartizate în regiunea anodică şi 7 în regiunea catodică a electroforegramei. Proteinele solubile din endospermul luat împreună cu scutelul seminţelor de porumb se separă în gel de agar în 14 fracţiuni, 6 repartizate în regiunea anodică şi 8 în regiunea catodică.

Analiza imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germenul seminţei de porumb cu antiserul omolog pune în evidenţă existenţa a cel puţin 15 antigeni, iar pentru proteinele solubile din endosperm, luat împreună cu scutelul, a 13 antigeni.

Nu s-au putut pune în evidenţă diferenţe calitative între soiurile, respectiv varietăţile, seminţelor de porumb studiate prin aceste metode.

Proteinele solubile din germenii şi endospermii seminţelor de porumb au fost cercetate prin analiza electroforetică în mediu lichid [1] şi prin electroforeză pe hîrtie [2], [3].

În prezenta lucrare, ne-am propus cercetarea comportării electroforetice şi imunoelectroforetice, în gel de agar, a proteinelor solubile din germenii, respectiv endospermii luaţi împreună cu scutelul seminţelor de porumb.

Cercetarea a avut un dublu scop : caracterizarea proteinelor solubile din germeni şi din endospermi luaţi împreună cu scutelul, din punctul de vedere al comportării lor electroforetice în gel de agar, ca şi din punct de vedere imunochimic, precum şi compararea acestor caractere la proteinele extrase din seminţe ale unor soiuri şi varietăţi diferite.

În literatura consultată nu s-a găsit indicată cercetarea proteinelor solubile din germenii şi endospermii de porumb, nici prin electroforeza în gel de agar şi nici prin metode imunochimice.

MATERIALE ŞI METODE

S-a lucrat cu seminţe de porumb aparţinînd la 3 soiuri : două soiuri — ICAR-54 şi Lester Pfister — din varietatea indentata, şi unul — Dobrogean — din varietatea indurata.

Pentru separarea de germeni a endospermilor luaţi împreună cu scutelul, seminţele de porumb s-au ţinut în apă timp de 3—4 ore, la temperatura camerei, apoi cu ajutorul unui

bisturiu s-a îndepărtat învelişul bobului şi s-a separat manual germenele. După uscarea la temperatura camerei, endospermii cu scutelul s-au măcinat în cantităţi mici, pentru ca moara de laborator să nu se încălzească, iar făina s-a trecut printr-o sită cu ochiuri de 0,5 mm. Germenii s-au mojarat.

Extracţia proteinelor din *germeni* s-a efectuat după principiul metodei date de E.T. Mertz şi colaboratori [1], de exemplu : 2 g germeni de porumb s-au mojarat şi s-au adăugat 10 ml soluţie de tampon acid boric-borax, pH 8,2, şi 25 ml soluţie de clorură de sodiu 12%, după care proba s-a îngheţat şi dezgheţat de trei ori. Pentru extracţie s-a agitat timp de o jumătate de oră, după care s-a adăugat butanol 1—2 volume faţă de extract, s-a agitat puternic 10 min şi s-a centrifugat la temperatura camerei. Dacă extractul care era în partea de jos a eprubetei nu era limpede, s-a repetat extracţia cu butanol. Extractul astfel obţinut s-a supus dializei faţă de apă distilată timp de 16 ore, pentru a îndepărta sărurile şi urmele de butanol. Extractul a fost întrebuinţat ca atare sau după liofilizare.

Pentru extracţia proteinelor din făina de *endospermi şi scutel* s-a folosit soluţia de tampon acid succinic 0,013 M-hidroxid de sodiu 0,0224 M, pH 8,6 în raportul 1 g făină/2 ml soluţie. S-a agitat o oră la temperatura camerei sau s-a lăsat la frigider 16 ore. S-a centrifugat, supernatantul era extras cu butanol 1—2 volume faţă de extract, s-a dializat şi apoi liofilizat, ca şi în cazul germenilor.

Extracţia proteinelor nu s-a făcut cu acelaşi sistem tampon, deoarece după experienţa noastră am ales extractantul cel mai potrivit în funcţie de organul din care se făcea extracţia. Folosirea unui extractant comun avea avantajul lucrului în condiţii experimentale riguros asemănătoare, însă din cauza organelor diferite pe care s-a lucrat nu aveam nici în acest caz garanţia că ambele ţesuturi cedau toate proteinele sau procentual aceleaşi proteine.

Prepararea antiserurilor. S-a lucrat cu antigene liofilizate dizolvate în soluţie fiziologică sau cu extract neliofilizat la care s-a adăugat clorură de sodiu cristale, pentru a avea concentraţia soluţiei fiziologice. S-a adăugat hidroxid de aluminiu ca adsorbant şi adjuvant al antigenelor. Imunizarea s-a făcut cu aproximativ 180 mg proteină per animal, fracţionată în 8—10 doze crescînde, la interval de 4—7 zile. Iepurii au fost sîngeraţi după 10 zile de la ultima injecţie. Titrul serurilor s-a determinat după metoda Uhlenhut. Titrul precipitant a fost între 3,0 — 1,5 μg/ml antigen. S-au preparat seruri antiproteină din germeni, respectiv antiproteină din endospermi luaţi împreună cu scutelul, pentru fiecare din cele 3 soiuri luate în cercetare.

Analize chimice şi imunologice. Determinarea cantitativă a proteinelor în preparatele liofilizate s-a făcut după metoda Lowry, modificată după G.L. Miller [4], sau spectrofotometric. Curba etalon era făcută cu serumalbumină de bou. Preparatul liofilizat conţinea 50—60% proteină.

Electroforeza în gel de agar şi imunoelectroforeza s-au efectuat după micrometoda Scheidegger [5], folosind ca tampon acid succinic 0,013 M—hidroxid de sodiu 0,0224 M, cu adaos de fosfat disodic M/60 vol /vol., pH final 8,4, gelul de agar fiind făcut în acelaşi tampon, diluat 1/3. Concentraţia proteinei pusă la electroforeză era de 1%, la un potenţial de 22,5 V/cm, intensitatea curentului 1 mA/cm, durata migrării 2 ore şi 30 minute, la temperatura camerei. După fixare şi uscare, gelul se colora cu Amidoschwàrz [6].

În cazul imunoelectroforezei, după ce se adăuga antiserul, plăcile se lăsau 5—7 zile într-o cameră umedă, pentru difuzie. Erau necesare minimum 5 zile, deoarece pe imunoelectroforegramele proteinelor din germeni una din liniile de precipitare (cea mai dinspre polul negativ) se contura în a cincea zi.

S-au efectuat imunoelectroforeze de control şi s-a constatat că serul sanguin de iepure nu dă linii de precipitare cu antigenele din germenul, respectiv endospermul luat împreună cu scutelul seminţei de porumb.

REZULTATE

Electroforeza în gel de agar. Proteinele solubile din *germenul* seminţei de porumb se separă prin electroforeza în gel de agar într-un număr mai mare de fracţiuni decît pe hîrtie. La electroforeza pe hîrtie se separau 4 fracţiuni, pe cînd la electroforeza în gel de agar s-au separat 14 fracţiuni, 7 repartizate în regiunea anodică şi 7 repartizate în regiunea catodică (fig. 1).

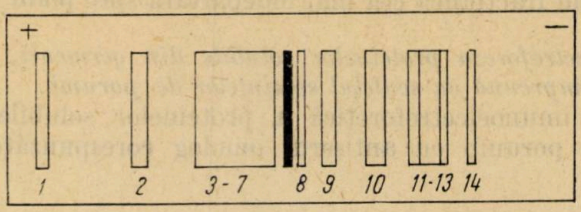


Fig. 1. — Electroforegrama proteinelor solubile din germenul seminţelor de porumb în gel de agar.
▬ startul.

Fracţiunile 1 şi 14 se pun în evidenţă cînd se aplică o cantitate mai mare de proteină.

Modul de repartizare şi numărul fracţiunilor proteice din germeni, la electroforeza în gel de agar, sînt asemănătoare la cele 3 soiuri de seminţe de porumb cercetate, ceea ce ne arată că nu se pot pune în evidenţă diferenţe calitative între proteinele din germenii care provin din soiuri, respectiv varietăţi diferite.

Proteinele solubile din *endospermul luat împreună cu scutelul* seminţelor de porumb s-au separat prin electroforeza pe hîrtie în 5 fracţiuni, pe cînd la electroforeza pe gel de agar în 14 fracţiuni, 6 repartizate în regiunea anodică şi 8 repartizate în regiunea catodică (fig. 2).

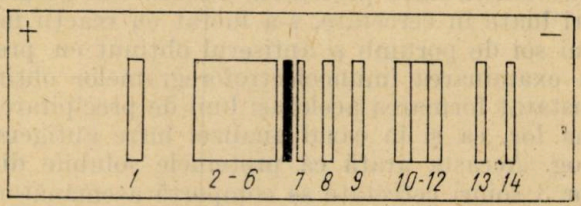


Fig. 2. — Electroforegrama proteinelor solubile din endospermul luat împreună cu scutelul seminţelor de porumb în gel de agar.
▬ startul.

Şi în acest caz fracţiunile 1 şi 14 se pun în evidenţă cînd se aplică o cantitate mai mare de proteină.

Comparînd electroforegramele obţinute cu extractele proteinelor din cele 3 soiuri de porumb, s-a constatat că sînt asemănătoare şi că deci nu se pot pune în evidenţă diferenţe în ceea ce priveşte mobilitatea electroforetică între proteinele din endospermii luaţi împreună cu scutelul, provenite din soiuri, respectiv varietăţi diferite.

Din analiza comparativă a electroforegramelor obţinute cu proteinele solubile din germeni şi endospermi luaţi împreună cu scutelul se constată că numărul fracţiunilor şi repartizarea lor după mobilitatea electroforetică sînt aceleaşi, cu excepţia faptului că germenii conţin în plus o cantitate mică de proteină încărcată mai puternic electronegativ şi care migrează mult spre polul pozitiv, formînd fracţiunea cea mai îndepărtată de start, notată cu cifra 1, pe cînd endospermii luaţi împreună cu scutelul conţin o cantitate mică de proteină încărcată ceva mai electropozitiv, formînd fracţiunea cea mai îndepărtată spre polul negativ, notată cu cifra 14.

Imunoelectroforeza proteinelor solubile din germenii, respectiv endospermii luaţi împreună cu scutelul seminţelor de porumb.

Analiza imunoelectroforetică a proteinelor solubile din *germenul* seminţelor de porumb cu antiserul omolog corespunzător este redată în figura 3.

Fig. 3. — Imunoelectroforeza proteinelor solubile din germenul de porumb.

Se constată formarea a 15 linii de precipitare, repartizate atît în zona anodică cît şi în cea catodică a plăcii. Se remarcă existenţa a două linii de precipitare foarte intense, ale căror extremităţi formează un evantai.

Pentru a cerceta din punct de vedere imunochimic identitatea sau diferenţierea care există între proteinele solubile din germenii de porumb ai celor 3 soiuri luate în cercetare, s-a lucrat cu reacţii încrucişate între proteina fiecărui soi de porumb şi antiserul obţinut cu proteina solubilă din alt soi. La examinarea imunoelectroforegramelor obţinute în aceste condiţii s-a constatat formarea aceloraşi linii de precipitare, după număr, poziţie şi forma lor, ca şi în cazul analizei între antigenul respectiv şi antiserul omolog. Aceasta arată că proteinele solubile din germenii de porumb ai celor 3 soiuri cercetate se comportă asemănător din punct de vedere antigenic.

Această concluzie s-a verificat şi prin analiza imunoelectroforetică cu antiseruri absorbite. Antiserul astfel prelucrat nu mai dă linii de precipitare la reacţia omologă. Astfel nu s-au putut pune în evidenţă antigene caracteristice de soi sau varietate.

Analiza imunoelectroforetică a proteinelor solubile din *endospermul luat împreună cu scutelul* seminţei de porumb cu antiserul omolog corespunzător este redată în figura 4.

Se constată formarea a 13 linii de precipitare, repartizate atît în zona anodică cît şi în cea catodică a plăcii. Aici se remarcă în special existenţa arcurilor alungite, ceea ce arată fie existenţa unor antigene

identice, cu mobilităţi diferite, fie reţinerea parţială a antigenului de către gel, în timpul electroforezei.

Şi în cazul endospermilor luaţi împreună cu scutelul imunoelectroforeza s-a lucrat prin reacţii încrucişate între proteina fiecărui soi de porumb şi antiserul obţinut cu proteina din alt soi de porumb. De asemenea

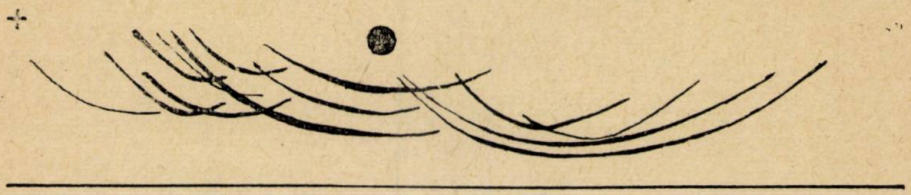


Fig. 4. — Imunoelectroforeza proteinelor solubile din endospermul luat împreună cu scutelul de porumb.

s-a lucrat cu antiseruri absorbite încrucişat. Nici în cazul proteinelor solubile din endospermii luaţi împreună cu scutelul de la cele 3 soiuri de porumb cercetate nu s-au pus în evidenţă antigene caracteristice pentru soi sau varietate.

CONCLUZII

1. Electroforeza în gel de agar a proteinelor solubile din germenii, respectiv din endospermii luaţi împreună cu scutelul seminţelor de porumb, pune în evidenţă, în ambele cazuri, existenţa a 14 fracţiuni proteice. Cu toate că avem de-a face cu o fracţionare destul de avansată a proteinelor, nu se poate pune în evidenţă o diferenţiere a soiurilor şi varietăţilor după numărul de fracţiuni proteice.

2. Analiza imunoelectroforetică a proteinelor solubile din germenul seminţei de porumb cu antiserul omolog pune în evidenţă existenţa a 15 linii de precipitare, ceea ce arată existenţa a cel puţin 15 antigeni, iar pentru proteinele solubile din endospermul luat împreună cu scutelul, a 13 linii de precipitare, ceea ce arată existenţa a cel puţin 13 antigeni. Nici în cazul germenului, nici în cazul endospermului luat împreună cu scutelul, nu s-au putut pune în evidenţă antigene caracteristice pentru soiul sau varietatea din care făceau parte.

Prezentată la redacţie la 1 aprilie 1967

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. T. Mertz, N. E. Lloyd, R. Bressani, *Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts*, Cereal Chem., **35**, *2*, 146 (1958).
2. V. Alexandrescu, *Localizarea activităţii amilazei şi invertazei pe fracţiunile proteice solubile din seminţele de porumb*, St. cerc. biochim., **5**, *1*, 7 (1962).
3. V. Alexandrescu, *Comportarea electroforetică a proteinelor solubile din germenii diferitelor soiuri de porumb*, St. cerc. biochim., **7**, *3*, 347 (1964).

4. G. L. Miller, *Protein determination for large numbers of samples*, Analyt. Chemistry, **31**, 964 (1959).

5. J. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).

6. P. Grabar, P. Burtin, *Analyse immuno-électrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques*, Masson, Paris, 1960, p. 38.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 4, 307–311 (1967)

FOSFOLIPIDELE DIN MUŞCHIUL SCHELETIC DE BROASCĂ ÎN DIFERITE STĂRI FUNCŢIONALE

DITA COTARIU şi MIHAIL ŞERBAN

611.018.6

REZULTATE

Rezumat. — S-a cercetat efectul unor factori care modifică starea fiziologică normală a muşchiului asupra variaţiei cantitative şi calitative a conţinutului fosfolipidic. S-a stabilit o creştere a conţinutului fosfolipidic total, respectiv o modificare a spectrului cromatografic al fosfolipidelor musculare după secţionarea nervului, precum şi după stimulare electrică. Se discută semnificaţia modificărilor observate, în corelaţie cu ansamblul proceselor metabolice legate de starea funcţională a muşchiului.

Fosfolipidele sînt prezente în toate celulele vii, intrînd în structura fundamentală a citoplasmei însăşi. După cunoştinţele actuale, ele nu sînt însă numai elemente structurale, inactive, ci componente dinamice, într-un continuu proces de reînnoire (1). Mai mult, există un paralelism între cantitatea de fosfolipide dintr-un ţesut şi activitatea funcţională a ţesutului respectiv (2).

Comparativ cu alte ţesuturi, fosfolipidele sînt prezente în celula musculară în cantitate relativ mică, dar par să joace aici un rol activ datorită participării lor la permeabilitatea membranei celulare, la transportul activ al ionilor, precum şi la diferite sisteme enzimatice complexe. Deşi importanţa fosfolipidelor pentru metabolismul celular este indubitabilă, funcţiile specifice ale speciilor fosfolipidice individuale, semnificaţia fiziologică a reînnoirii lor continue în ţesuturi, precum şi modul în care mediul fiziologic influenţează sau controlează viteza lor de sinteză sau de catabolism, sînt departe de a fi cunoscute.

În lucrarea de faţă ne-am propus să studiem efectul unor factori care modifică starea fiziologică normală a muşchiului, asupra conţinutului său în fosfolipide. În acest scop, am urmărit influenţa întreruperii transmisiei nervoase (denervarea muşchiului) sau a blocării ei la nivelul joncţiunii neuro-musculare (curarizare, narcoză cu anestezici locali), precum şi influenţa activităţii induse (stimularea electrică a muşchiului) asupra variaţiei cantitative a fosfolipidelor totale şi a modificărilor calitative ale speciilor fosfolipidice individuale, separate prin cromatografie în strat subţire.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au efectuat pe extracte lipidice totale, obţinute din muşchi gastrocnemian de *Rana ridibunda*.

Animalele au fost împărţite în loturi, precum urmează :

1) broaşte cărora li s-a secţionat nervul sciatic ; sacrificarea s-a practicat după 1, 4, 8, respectiv 20 de zile de la intervenţie ;

2) broaşte cărora li s-au injectat, în sacul dorsal limfatic, 2 mg flaxedil în soluţie apoasă, cu o oră înainte de sacrificare ;

3) broaşte cărora li s-au injectat, în sacul dorsal limfatic, 5 mg clorhidrat de novocaină în soluţie apoasă, cu o oră înainte de sacrificare ;

4) broaşte ai căror muşchi au fost stimulaţi electric. Muşchii prelevaţi cu grijă au fost supuşi imediat tetanizării : s-au aplicat 300, 1500, respectiv 3000 de impulsuri (5 imp./sec) timp de 5 msec ;

5) broaşte martor, normale.

La fiecare dintre variantele experimentale studiate s-au folosit cîte 30—40 de animale, efectuîndu-se cîte 10 determinări, pe probe medii de 3—4 muşchi. Rezultatele au fost supuse apoi calculului varianţei.

Extracţia fracţiunii lipidice s-a efectuat, în principiu, după metoda Folch [3], în condiţiile descrise într-o lucrare anterioară [4].

Determinarea cantitativă a lipidelor totale s-a efectuat gravimetric. Determinarea cantitativă a fosfolipidelor s-a efectuat pe extracte lipidice totale. Fosforul eliberat a fost dozat cu molibdat de amoniu şi acid 1-amino-2-naftol-4-sulfonic ca reducător [5]. Ca etalon s-a utilizat o soluţie de KH_2PO_4 cu o concentraţie în P de 81 μg/ml.

Separarea fosfolipidelor s-a efectuat prin cromatografie în strat subţire. S-a lucrat pe plăci de sticlă de 18/20 cm, utilizînd ca suport de migrare Kieselgel G nach Stahl Merck, în suspensie apoasă (1 : 2, g/v). S-au aplicat 50 μl de extract lipidic concentrat în prealabil (2/1). Ca lichid de irigare s-a utilizat un amestec de $CHCl_3$: CH_3 OH : H_2O(70/30/5) preparat extemporaneu. Timpul de irigare a fost de 30 min. Evidenţierea componentelor separate s-a făcut cu vapori de iod. S-au efectuat concomitent şi unele reacţii specifice (ninhidrină, reactiv Dragendorff, lumină ultravioletă). În scopul identificării diferitelor componente separate, s-au cromatografiat de asemenea şi unele soluţii lipidice de referinţă [4].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele determinărilor de fosfolipide totale din muşchiul gastrocnemian de broască, în diferite stări funcţionale, sînt prezentate în figura 1.

Examinînd diagrama, constatăm că în cazul muşchiului denervat, nivelul fosfolipidelor totale creşte apreciabil ($P < 0{,}01$) în primele 24 de ore de la intervenţie, prezentînd apoi o tendinţă de normalizare după 4 zile ($P > 0{,}05$) ; după 8, respectiv 20 de zile de la secţionarea nervului, se constată din nou o creştere semnificativă a nivelului fosfolipidelor totale ($P < 0{,}01$)

Faptul că în urma denervării metabolismul normal al muşchiului prezintă o serie de dereglări este bine cunoscut, dar pînă în prezent nu s-a stabilit care este leziunea biochimică primară care iniţiază procesul. După datele experimentale disponibile, modificările observate în muşchii denervaţi sînt considerate ca rezultat al unui fenomen general de degene-

rare, survenit în mușchiul scos de sub controlul trofic exercitat de sistemul nervos; majoritatea acestor modificări se observă însă după un anumit interval de la denervare, o dată cu apariția procesului de atrofie, fiind considerate mai curînd efectul decît cauza acestuia. Din acest punct de vedere, creșterea fosfolipidelor, constatată de noi după 8, respectiv 20 de zile de la secționarea nervului, se încadrează desigur în tabloul general al transformărilor degenerative care apar în mușchi consecutiv denervării. Ea ar putea fi considerată ca o expresie a dereglării metabolismului fosfolipidelor în sensul unui anabolism crescut. O creștere similară a fosforului lipidic, după 1—3 luni de la secționarea nervului sciatic, a fost semnalată și în mușchii de mamifere [6], [7]. Pe de altă parte însă, se constată o creștere apreciabilă a conținutului fosfolipidic al mușchiului încă din primele 24 de ore de la denervare. Această modificare precoce apare ca un efect mai mult sau mai puțin imediat al întreruperii transmisiei nervoase. Ea ar putea proveni dintr-o acțiune directă a nervului asupra metabolismului muscular. Se știe că la animalul adult, procesul continuu de sinteză de fosfolipide în țesuturi este echilibrat printr-un catabolism corespunzător, astfel încît să se mențină o concentrație de echilibru. În aceste condiții, secționarea nervului ar putea induce, de pildă, o perturbare a vitezelor relative ale proceselor de sinteză și degradare, echilibrate în condițiile reînnoirii dinamice normale.

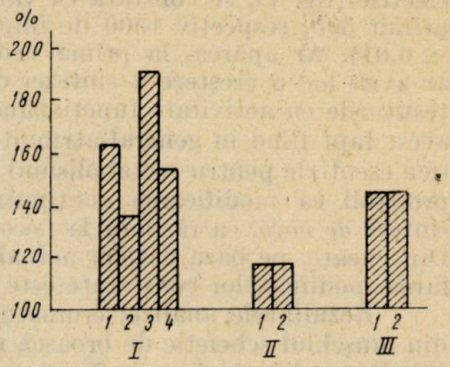


Fig. 1. — Variația fosfolipidelor totale din mușchiul gastrocnemian de broască în diferite stări funcționale, exprimată în procente față de valoarea corespunzătoare mușchiului normal, în repaus.
I. Întreruperea transmisiei nervoase (denervare): *1* = 1 zi ($P < 0,01$); *2* = 4 zile ($P > 0,05$); *3* = 8 zile ($P < 0,01$); *4* = 20 zile ($P < 0,01$).
II. Blocarea transmisiei nervoase: *1* = curarizare ($P > 0,05$); *2* = narcoză ($P > 0,05$).
III. Stimulare electrică: *1* = 300 impulsuri ($P < 0,01$); *2* = 1500 impulsuri ($P < 0,01$).

Creșterea precoce observată ar putea fi însă și rezultatul unei acțiuni indirecte asupra permeabilității celulei musculare. Orice celulă, cu excepția hematiilor, este virtualmente capabilă să-și sintetizeze din molecule mici (colină, etanolamină, acizi grași, glicerol, fosfat etc.) toate speciile de fosfolipide. Modificarea de permeabilitate indusă de întreruperea transmisiei nervoase ar putea facilita pătrunderea — din plasma sanguină în celulă — a unora dintre aceste componente, favorizînd astfel un eventual proces de sinteză. Este, de asemenea, interesant de remarcat că, după 4 zile de la intervenție, nivelul fosfolipidelor totale prezintă o tendință de normalizare.

Din datele disponibile pînă în prezent este greu să se tragă o concluzie asupra semnificației fiziologice a fenomenelor observate. Pare probabil că modificările precoce, respectiv tardive ale fosfolipidelor totale din mușchi, deși ambele rezultate ale întreruperii transmisiei nervoase, să prezinte totuși cauze și mecanisme de apariție diferite.

Examinînd rezultatele determinărilor de fosfolipide în mușchii curarizați, respectiv narcotizați (fig. 1), se constată că valorile obținute sînt de același ordin de mărime cu ale martorului normal. Apare astfel

că blocarea transmisiei nervoase la nivelul joncţiunii neuro-musculare nu induce, cel puţin în condiţiile noastre de experienţă, vreo modificare apreciabilă a conţinutului fosfolipidic total din muşchi. Acest fapt nu este surprinzător, dat fiind că timpul scurs de la blocarea transmisiei nervoase pînă la sacrificarea animalelor a fost relativ scurt.

Analizînd, în continuare, rezultatele obţinute la muşchi stimulaţi electric (fig. 1), se constată că valorile fosfolipidelor din muşchii care au primit 300, respectiv 1500 de impulsuri, sînt semnificativ crescute ($P < 0{,}01$). Ar apărea, la prima vedere, că în cursul activităţii musculare ar avea loc o creştere a sintezei de fosfolipide. Se ştie, într-adevăr, că ţesuturile cu activitate funcţională ridicată sînt bogate în fosfolipide [2], acest fapt fiind în general atribuit asocierii acestora cu sistemele enzimatice esenţiale pentru metabolismul celular. În cazul nostru însă, este puţin probabil ca modificarea conţinutului fosfolipidic să se datoreze unei sinteze *de novo*, ca răspuns la necesităţile energetice crescute ale celulei. Din păcate, pe baza datelor actualmente existente în literatură, interpretarea modificărilor constatate este pentru moment dificilă.

Rezultatele analizei cromatografice în strat subţire a fosfolipidelor din muşchiul scheletic de broască normal şi în diferite condiţii experimentale sînt redate în figurile 2 şi 3.

Examinînd figurile, se constată, la toate variantele studiate, prezenţa lizofosfatidilcolinei — LPC, lizofosfatidiletanolaminei — LPE, fosfatidilcolinei — PC (+ plasmalogencolina), fosfatidiletanolaminei — PE (+ plasmalogenetanolamina), precum şi a urmelor de acizi fosfatidici.

În toate cazurile, PC (+ PLC) şi PE (+ PLE) se caracterizează printr-o valoare cantitativă ridicată, pe cînd ceilalţi componenţi fosfolipidici se află în raporturi cantitative evident mai scăzute. Unele diferenţe între variantele cercetate se constată în special la nivelul unor produşi de liză ai fosfolipidelor. Astfel, la muşchiul denervat (în special după 20 de zile), se evidenţiază prezenţa lizofosfatidiletanolaminei ca un component distinct, de altfel ca şi în cazul muşchiului curarizat. În cazul muşchilor stimulaţi electric (300, 1500, respectiv 3000 de impulsuri), spotul lizofosfatidilcolinei apare mai intens decît la muşchii în repaus.

Din datele analizei cromatografice în strat subţire rezultă că starea funcţională a muşchiului are repercusiuni la nivelul anumitor specii fosfolipidice. Astfel, modificările de ordin cantitativ ale fosfolipidelor totale, coroborate cu rezultatele calitative furnizate de analiza cromatografică, indică participarea acestor componente la ansamblul proceselor metabolice legate de starea funcţională a muşchiului. Cunoştinţele actuale referitoare la metabolismul fosfolipidic sînt încă reduse, şi, de aceea, conturarea rolului fosfolipidelor în activitatea funcţională a celulei musculare rămîne mai departe o problemă deschisă.

CONCLUZII

Consecutiv întreruperii transmisiei nervoase s-a pus în evidenţă o creştere a conţinutului fosfolipidic total, precum şi o modificare a spectrului cromatografic al fosfolipidelor, exprimată prin apariţia lizofosfatidiletanolaminei ca un component distinct.

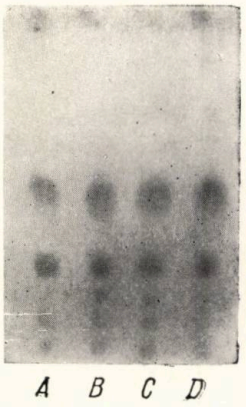


Fig. 2. — Cromatogramă în strat subțire a fosfolipidelor din mușchiul gastrocnemian de broască normal (*A*), denervat 20 zile (*B*, *C*) și curarizat (*D*).

1 = lizofosfatidilcolina,
2 = lizofosfatidiletanolamina
3 = fosfatidilcolina (+ plasmalogencolina),
4 = plasmalogenetanolamina,
5 = fosfatidiletanolamina,
6 = acizi fosfatidici (urme).

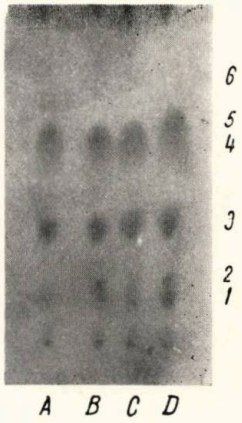


Fig. 3. — Cromatogramă în strat subțire a fosfolipidelor din mușchiul gastrocnemian de broască normal (*A*) și stimulat electric : (*B*) 300 impulsuri ; (*C*) 1500 impulsuri ; (*D*) 3000 impulsuri.

1 = lizofosfatidilcolina,
2 = lizofosfatidiletanolamina,
3 = fosfatidilcolina (+ plasmalogencolina),
4 = plasmalogen-etanolamina,
5 = fosfatidiletanolamina,
6 = acizi fosfatidici (urme).

După blocarea transmisiei nervoase la nivelul joncțiunii neuromusculare (curarizare) s-a evidențiat — prin analiză cromatografică — prezența lizofosfatidiletanolaminei ca un component distinct.

După stimularea electrică a mușchiului, s-a pus în evidență creșterea conținutului fosfolipidic total, precum și intensificarea spotului lizofosfatidilcolinei (analiza cromatografică).

Modificările de ordin cantitativ, coroborate cu rezultatele analizei cromatografice în strat subțire, indică participarea fosfolipidelor la procesele metabolice legate de starea funcțională a mușchiului.

Mulțumim lui T. Benția pentru asistența tehnică.

Prezentată la redacție la 1 iunie 1967

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. R. M. C. Dawson, *The metabolism of animal phospholipids and their turnover in cell membranes*, în *Essays in Biochemistry*, sub red. P. N. Campbell și G. D. Greville, vol. 2, Academic Press, New York, 1966.
2. W. R. Bloor, R. W. Snider, *Phospholipid content and activity in muscle*, J. biol. Chem., **107**, 459 (1934).
3. J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*, J. biol. Chem., **226**, 497 (1957).
4. M. Șerban, *Studiul comparativ al fosfolipidelor din musculatura striată și netedă prin cromatografie în strat subțire*, St. cerc. biochim., **10**, 155 (1967).
5. S. Natelson, *Microtechniques of clinical chemistry*, Springfield, Illinois, 1963.
6. П. С. Канашенок, М. М. Ключарева, *Содержание липидов в икроножных мышцах кроликов после перерезки большеберцового нерва*, Бюл. Эксп. Биол. и Мед., **12**, 36 (1956).
7. H. Yoshida, *Process of property changes of muscle induced by peripheral denervation*, Nagoya Med. J., **9** (1), 27 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 4, 313–317 (1967)

MODIFICĂRI ÎN ACTIVITATEA GLUCOZO-6-FOSFAT-NADP-OXIDOREDUCTAZEI ÎN FICAT ŞI ÎN ERITROCITELE DE ŞOBOLAN CU EPITELIOM GUÉRIN LIMFOID

CAROLINA FAIGHELIŞ, I. IANCU, C. COTRUTZ, MARIA PIEPTU, L. ABABEI

Rezumat. — Pornind de la constatările că în tumori găsim o metabolizare a glucozei, activă atît pe calea Embden-Meyerhof cît şi pe calea pentozo-fosforică, ca şi de la constatările că modificări metabolice în boala canceroasă apar nu numai în ţesutul tumoral ci şi în alte ţesuturi din organism, am studiat comportarea G6PDH în ficatul şi eritrocitele de şobolan cu epiteliom Guérin limfoid, cu metastaze.

Am constatat o diminuare a capacităţii acestei enzime atît în ficatul cît şi în eritrocitele de şobolan cu tumoră, faţă de şobolanul martor. Cu GSH am obţinut la o concentraţie de 5×10^{-3}M o inhibare a enzimei din ficat, care s-ar putea explica prin formarea de grupări P—S—S—R mixte, provenind de la proteina enzimatică şi de la GSH.

Interesant este faptul că cu Mg^{++} inactivarea produsă de GSH este reversibilă atît la enzima din ficatul animalelor normale cît şi la cea din ficatul animalelor cu tumoră. Probabil că această reactivare se datoreşte unei afinităţi mai mari a grupului —SH al enzimei pentru Mg^{++}.

Încă cu 40 de ani în urmă, Warburg [14], [15] a arătat că în tumori se constată o glicoliză crescută. Studii enzimologice au arătat ulterior că, în ţesuturile tumorale, atît calea Embden-Meyerhof cît şi cea pentozo-fosforică sînt active în metabolismul glucozei [5], [7], [16].

Recent s-a demonstrat că lactatoxidoreductaza din celulele ascitice tumorale are capacitatea de a reacţiona atît cu NAD cît şi cu NADP. De asemenea, în aceste celule s-au descris enzime capabile să oxideze $NADH_2$ şi $NADPH_2$ [1], [12]. În acest fel, în aceste celule, prin aceste enzime s-a făcut o legătură între drumul Embden-Meyerhof şi calea oxidativă pentozo-fosforică de metabolizare a glucozei. De altă parte, studiindu-se activitatea 1-glutamat-NAD-oxidoreductazei în ficatul de şobolan normal şi în ficatul de şobolan cu epiteliom Guérin limfoid cu metastaze multiple, s-a constatat că în ficatul şobolanului cu tumoră, constanta de inhibiţie a acestei enzime cu sulfat de zinc este modificată faţă de enzima din ficatul animalului sănătos. De asemenea, s-a constatat o diminuare a capacităţii reactive a acestei enzime în ficatul şobolanului cu tumoră [13]. Abraham şi Chaikoff [2], studiind formarea de $^{14}CO_2$ şi de ^{14}C-acizi graşi din glucoza marcată cu $^{14}C_1$, $^{14}C_6$ şi ^{14}C all, au constatat că la şoarecii cu adenocarcinom formarea de $^{14}CO_2$ din glucoza $^{14}C_1$ este mult diminuată faţă de glanda mamară a animalelor sănătoase. De aici putem deduce că, în general, metabolizarea glucozei pe calea pentozo-fosforică NADP dependentă este scăzută.

Pornind de la considerentul că în boala canceroasă există modificări esenţiale în metabolismul ţesuturilor, aşa cum găseşte Wu în hepatomul Morris pentru metabolismul glutaminei în rinichi şi cum am constatat noi în epiteliomul Guérin în ficat pentru 1-glutamat-NAD-oxidoreductază [8], ne-am propus să studiem comportarea glucozo-6-fosfat-NADP-oxidoreductazei (G6PDH) în ficatul şi eritrocitele şobolanilor normali şi, comparativ, la şobolanii cu epiteliom Guérin limfoid cu metastaze multiple. Rezultatele acestor studii le vom prezenta aici.

MATERIAL ŞI METODĂ

În experienţe au fost utilizaţi şobolani albi comuni. Fragmente de tumoră Guérin au fost introduse subcutan în regiunea abdominală anterioară. Probele de analizat s-au recoltat la circa 3 săptămîni după grefare, după ce s-a constatat în prealabil dezvoltarea tumorii. Morfohistologic s-a evidenţiat dezvoltarea aceluiaşi tip de tumoră Guérin.

Ficatul a fost omogenizat într-un omogenizator tip Potter-Elvehjem, în 10 volume de etilendiamintetraacetat (EDTA), în concentraţie de $6{,}6 \times 10^{-4}$ în sol. fiziologică. Omogenatul a fost centrifugat într-o centrifugă cu sistem de răcire tip Zugloi Gépgyàr Budapesta L.H. 412, la 3300 *g*, timp de 10 minute. Supernatantul a fost folosit pentru determinările enzimatice.

Eritrocitele au fost obţinute în felul următor: prin puncţie cardiacă s-a scos cu o seringă sterilă sîngele cu heparină, care imediat s-a centrifugat la rece, la 1000 *g*, timp de 5 minute. Serul a fost decantat, iar eritrocitele au fost spălate de trei ori cu o soluţie de 0,9% NaCl, prin centrifugare la rece, la 1200 *g*, cîte 5 minute. Eritrocitele astfel spălate au fost hemolizate cu apă distilată la rece, în raport de 1 : 5. Hemolizatul obţinut a fost din nou centrifugat la 3300 *g* timp de 10 minute, iar supernatantul s-a folosit pentru determinările enzimatice.

Determinarea G6PDH s-a făcut în ficat şi eritrocite, în soluţie tampon de TRIS-maleat la pH 7,4 (10). NADP-ul folosit a fost procurat de la Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland Ohio. Determinările s-au făcut spectrofotometric, la 340 mμ, cu spectrofotometrul VSU 1 Carl Zeiss, Jena.

Glutationul redus (GSH) a fost un produs E. Merck A.G. Darmstadt.

REZULTATE

Tabela 1 prezintă activitatea G6PDH în ficatul şi eritrocitele de şobolan normal şi de şobolan cu tumoră Guérin cu metastaze. Se vede că

Tabela 1

Activitatea G6PDH-NADP-oxidoreductazei în ficatul şi eritrocitele de şobolan normal şi cu epiteliom Guérin limfoid cu metastaze

	Martor	n	Tumoră	n
Ficat	$2{,}08 \pm 0{,}33$ $p > 0{,}01$	15	$1{,}32 \pm 0{,}19$ $p > 0{,}01$	15
Eritrocite	$0{,}81 \pm 0{,}6$ $p > 0{,}01$	10	$0{,}36 \pm 0{,}026$ $p > 0{,}01$	10

Activ G6PDH în μMol/g/minut în ficat

Activ G6PDH în μMol/ml/minut în eritrocite ; n = numărul de şobolani

atît în ficat cît şi în eritrocite G6PDH prezintă o scădere marcată de activitate la animalele cu tumori. În ficat, scăderea activităţii este de 37%, în eritrocite de 55,5% în comparaţie cu normalul.

Am încercat apoi să studiem efectul GSH asupra activităţii enzimatice la enzima provenită atît din ficatul de şobolan normal cît şi de la cel cu tumoră Guérin. Pentru G6PDH din eritrocite era descrisă în literatură posibilitatea de activare cu GSH, deoarece în eritrocite G6PDH este o SH-enzimă. În cazul enzimei din ficat, aşa cum arată tabela 2, G6PDH

Tabela 2

Inhibiţia G6PDH cu GSH şi reactivarea cu $MgCl_2$

	Ficat normal	n	Ficat tumoră	n
Control	2,08±0,33 p>0,01	15	1,32±0,19 p>0,01	15
+ GSH	1,26±0,34 p>0,001	15	0,67±0,06 p>0,001	15
+ $MgCl_2$	2,26±0,23 p>0,01	5	1,49±0,12 p>0,01	5
+ GSH + $MgCl_2$ 1×10^{-1}	1,92±0,27 p>0,05*	15	1,12±0,10 p>0,05	15
+ GSH + $MgCl_2$ 5×10^{-2}	1,39±0,18 p>0,05*	15	0,96±0,16 p>0,05	15

* p faţă de probabilitatea cu GSH.

nu numai că nu este stimulată cu GSH, dar este chiar inhibată. Inhibiţia este de circa 50% atît în cazul enzimei provenite de la ficatul normal cît şi în cazul celei de la animalul cu tumoră.

Din aceeaşi tabelă se vede că $MgCl_2$ reuşeşte să activeze într-o mică măsură enzima din ficatul ambelor grupuri de animale. În aceeaşi tabelă se vede că $MgCl_2$ poate reactiva G6PDH inhibată de GSH, precum şi că reactivitatea se intensifică cu creşterea concentraţiei de $MgCl_2$. La concentraţia 1×10^{-1}M reactivarea enzimei din ficatul normal pare să fie ceva mai pronunţată decît în cazul celei din ficatul animalului cu tumoră.

DISCUŢII

O serie de enzime din ser îşi modifică activitatea în boala canceroasă [3], [8], [11].

De Luca [16] observă o creştere constantă a haptoglobinemiei la bolnavii cu cancer localizat în diferite organe.

Wu [10] observă că activitatea glutamiltranspeptidazei scade în rinichi, dar nu în ficat şi în serul şobolanilor purtători de hepatoame Morris.

Și în epiteliomul Guérin limfoid s-au găsit modificări în activitatea unor enzime din ficat, față de enzimele din ficatul animalelor sănătoase.

Datele prezentate de noi arată, pe linia celor de mai sus, că la șobolanii cu epiteliom Guérin găsim în eritrocite și în ficat o diminuare mare a activității G6PDH, enzimă importantă în metabolismul glucozei pe calea pentozo-fosforică. Faptul că aceste enzime au o capacitate de activitate scăzută în eritrocite și în ficat arată că, în această formă de cancer, găsim tulburări metabolice importante și în organe aparent normale.

Aceste fapte vin să întărească și mai mult supoziția că în patologia cancerului este implicat întregul organism animal, modificările fiind însă deosebite în diferite organe; ele sînt vizibile în unele organe — acolo unde sînt localizate tumora sau metastazele — și necesită investigații speciale pentru a putea fi găsite în alte organe, așa cum arătăm în datele prezentate de noi.

Modul în care acționează elementele inductoare din tumoră și natura acestor elemente sînt încă necunoscute. Totuși, faptul că acțiunea lor este clară la distanță de locul de transplantare — și acestea ne-o dovedesc modificările observate de noi ca și posibilitatea de a genera metastaze — ne face să presupunem că este vorba de substanțe cu greutate moleculară mică, care au posibilitatea de a trece ușor prin membranele celulare.

În favoarea acestei ipoteze stau cercetările în domeniul carcinogenezei chimice. Inductorii aceștia probabil că sînt specifici pentru diferite celule, în funcție de diferențierea celulară. După ce au ajuns la celulele sensibile față de ei, acești inductori determină formarea unei noi categorii de inductori, naturali, produși acum de către țesutul propriu al organismului, de asemenea cu greutate moleculară mică, și care au posibilitatea să migreze și să producă modificări în alte țesuturi, poate tot selectiv (de aici ordinea în apariția metastazelor pornind de la tumora primară).

Fără îndoială că în acest caz sînt afectate structura și funcția acizilor nucleici și sinteza proteinelor.

În ceea ce privește faptul că G6PDH este inhibată de GSH, atît în ficatul normal cît și în cel al animalelor cu tumoră, s-ar putea presupune că enzima conține grupări —SH care, împreună cu grupările —SH ale GSH, duc la formarea de grupări —S—S— mixte care inactivează enzima. O astfel de explicație dă Bacq [4] pentru protecția cu cisteamină a unor enzime față de radiațiile ionizante. Reacția ar avea loc după modelul:

$$2P-SH + R-S-S-R = 2P-S-S-R$$

În această formulă, 2P—SH ar reprezenta 2 molecule de glutation redus, iar R—S—S—R ar fi o grupare —S—S— din proteina enzimatică. Presupunerea noastră că mecanismul acțiunii inhibitoare a GSH ar implica grupările —S—S— din proteină se bazează pe constatarea că această enzimă conține grupări —SH [18].

Reactivarea cu Mg^{++} după inhibarea cu GSH s-ar putea explica printr-o concurență pentru grupările —SH ale enzimei, cu care Mg^{++} poate forma legături covalente, așa cum sînt descrise de Kelly-Falcoz [19] în cazul galactoz-oxidazei.

Din datele prezentate rezultă că afinitatea pentru Mg^{++} este mai mare și că Mg^{++} poate reface activitatea enzimatică inițial inhibată de către GSH.

CONCLUZII

1. Se constată o diminuare a activității G6PDH în ficatul și eritrocitele de șobolan cu epiteliom Guérin limfoid cu metastaze, față de șobolanul martor.

2. Cu GSH s-a obținut la o concentrație de 5×10^{-3}M o inhibare a activității enzimei din ficat.

3. Cu $MgCl_2$ inactivarea produsă de GSH este reversibilă atît la enzima din ficatul animalelor normale cît și la enzima din ficatul animalelor cu tumoră.

Prezentată la redacție la 21 iulie 1966 *I.M.F. Iași*

BIBLIOGRAFIE

1. Ababei L., Sarkar S., *Über eine koenzym-unabhängige Laktat-oxidoreductase in Ascites Tumorzellen*, Acta Biol. Med. Germ., **14**, 128, 1965.
2. Abraham S., Chaikoff I. L., *Metaboslism of Bareti Mammary Adenocarcinoma: glucose utilization, fatty acid synthesis and terminal oxidation patterns and glutamine synthesis*, Cancer Res., **25**; 647, 1965.
3. Ames I. H., Albaum H. L., Antipol W., *Comparison of enzyme activity in malignant and adjacent uninvolved tissue*, Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), **116**; 1013, 1964.
4. Bacq Z. M., Alexander P., *Principes de radiobiologie*, Masson, Paris, 1955.
5. Bosch L., Von Vals G., Hand Emmelot P., *The metabolism of neoplastic tissues: demonstration of intermediates and reaction sequences of hexoze monophosphate oxidation pathway*, Brit. J. Cancer, **10**, 801, 1965.
6. De Luca F., *Il significato semiologico del dossagio dell'aptoglobinemia. Il comportamento della concentrazione ematica d'aptoglobina in pazienti portatori di neoplasia*, Riv. Pat. Clin., **19**, 7, 1964.
7. Glpch G. E., Mc Lean P., *Levels of enzymes of the direct oxydative pathways of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumors*, Biochem. J., **56**, 171, 1964.
8. Iancu I., Faigheliș C., *Cercetarea aldolazei în cancerul de prostată*, Comunicare Ses. șt. Inst. med. Iași, 1—2 dec. 1965.
9. Kelly-Falcoz F., Greenberg H., Horecker B. L., *Galactozo-oxidaze-studies on the structure and role of disulfide-linkages*, J. biol. Chem., **240**, 2966 1965.
10. Löhr W., Waller H. D., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*, în *Methoden der enzymatischen Analyse*, Hans H. U. Bergmeyer, p. 744, 1962.
11. Pinto I. J., Gajjar J. K., Vyas S. A., *The comparative value of serum isocitric dehydrogenase, serum glutamic oxalacetic transaminase, serum glutamic-pyruvic transaminase and serum alkaline phosphatase determinations in primary and metastatic neoplasms of the liver. A preliminary report*, Indian J. Cancer, **1**, 56, 1964.
12. Rapaport S., Ababei L., Wagenknecht C., Sarkar S., *Enzyme regulatory mechanisms at the level of lactate-oxidoreductase in erythrocytes and ascites tumour cells*, Nature, **208**, 185, 1965.
13. Trandafirescu M., Ababei L., *Some changes in the activity of the l-glutamat NAD-oxidoreductase (GLDH) of the rat liver with Guérin lymphoid epithelioma and after irradiation with X ray*, Nature, sub tipar.
14. Warburg O., *Versuche an überlebenden Carcinomgewebe* (*Methoden*). Biochem. Z., **142**, 317, 1923.
15. Warburg O., *Über den Stoffwechsel der Tumoren*, J. Springer, Berlin, 1926.
16. Weber G., *Pathology of glucose-6-phosphate metabolism. A study in enzyme pathology*, Rev. Canad. Biol., **18**, 245, 1959.
17. Wu C., Roberts E. H., Bauer J. M., *Enzymes related to glutamine metabolism in tumor bearing rats*, Cancer Res., **25**, 677, 1965.
18. Ababei L., Faigheliș C., Rezultate nepublicate.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 4, 319–324 (1967)

CERCETĂRI ASUPRA VALORIFICĂRII CORNULUI DE SECARĂ OBȚINUT PRIN CULTURI ÎN DIFERITE REGIUNI ALE ȚĂRII, DETERMINAREA ALCALOIZILOR TOTALI, LEVOGIRI ȘI A ERGOTAMINEI

A. GHEORGHIU, ELENA IONESCU-MATIU, FLORENTINA PLATON, VICTORIA LUPULESCU

Rezumat. — Făcînd cercetări asupra cornului de secară obținut prin culturi din diferite regiuni ale țării și din flora spontană autorii au constatat că :
Pe teritoriul țării noastre cornul de secară are o compoziție variată, atît după conținutul în ergotamină (0,02 — 0,27%) cît și după cel în alcaloizi levogiri (0,04 — 0,28%), exprimat în tartrat de ergotamină.
Selecționat numai pentru grupa ergotaminei poate fi considerat cornul de secară recoltat din regiunea București, raionul Titu, comuna Corbii, iar cu conținutul cel mai ridicat în alcaloizi levogiri acela provenit din regiunea Bacău, raionul Tg. Neamț.
La controlul calității cornului de secară este necesar să se aplice cromatografia pe hîrtie, urmată, în cazul dozării alcaloizilor levogiri, de procedeul fotocolorimetric cu reactivul Allport.

Se știe că cornul de secară conține alcaloizi cu activitate farmacodinamică complexă, ocitocică și simpaticolitică.

În numeroase țări, ca și la noi, se urmărește să se găsească o posibilitate de a se obține, prin infecții artificiale, corn de secară cu un conținut ridicat în alcaloizi și, în același timp, selecționat pe grupe de alcaloizi.

Cornul de secară provenit din flora noastră spontană s-a dovedit lipsit de alcaloizi sau cu un conținut sub 0,05%, fapt care a determinat pe unii cercetători români [1], [5], [6], [7], [9] să pună la punct un procedeu de laborator, obținînd prin infecții artificiale corn de secară cu un conținut în alcaloizi totali cuprins între 0,35 — 0,50%. Farmacopeea Română, ediția a VIII-a, prevede pentru cornul de secară un conținut în alcaloizi totali de cel puțin 0,20%, exprimat în tartrat de ergotamină.

Constantinescu și colab. [2] au obținut în culturile efectuate la stațiunea experimentală Domnești a Institutului pentru controlul de stat al medicamentului și cercetări farmaceutice unele tulpini selecționate pe grupe de alcaloizi : ergotamină și ergotoxină.

În vederea obținerii unei materii prime selecționate pe grupe de alcaloizi, constantă ca valoare terapeutică, care să conțină cîte una din cele trei grupe : grupa ergotaminei, grupa ergotoxinei și, pe cît posibil, grupa

ergometrinei, şi care să servească industriei la extragerea alcaloizilor puri, la prepararea derivaţilor lor dihidrogenaţi, cît şi la prepararea formelor medicamentoase, ne-am orientat cercetările asupra unor sorturi obţinute prin culturi în diferite regiuni ale ţării.

MATERIAL ŞI METODE

Ca material de cercetare am folosit cornul de secară[1] probe procurate de la staţiunile experimentale din următoarele regiuni ale ţării :

— *În Regiunea Bucureşti*, Raionul Titu, comuna Corbii, G.A.S. Vînători, în anul 1965 s-a infectat prin inoculare o suprafaţă de 25 de hectare cultivată cu Secale cereale, din care s-au obţinut 500 kg corn de secară.

În anul 1966 la Slobozia G.A.S. s-a infectat o suprafaţă de 25 de hectare, din care s-au obţinut 700 kg corn de secară.

— *În Regiunea Oltenia*, Raionul Calafat, comuna Calafat G.A.S., în anul 1965 s-a inoculat o suprafaţă de 26 de hectare din care s-au obţinut 403 kg corn de secară.

În anul 1966 s-a inoculat o suprafaţă de 35 de hectare în diferite terenuri experimentale : 10 hectare la Maglavit din care s-au recoltat 105 kg corn de secară ; 5 hectare la Goicea G.A.S., Raionul Băileşti din care s-au recoltat 60 kg corn de secară ; 5 hectare la Curmătura G.A.S. din care s-au recoltat 70 kg corn de secară ; 15 hectare la Cetate G.A.S. din care s-au obţinut 45 kg corn de secară. În total s-au obţinut 280 kg corn de secară.

— *În Regiunea Bacău*, Raionul Tg. Neamţ, G.A.S. Vînători în anul 1965 s-a inoculat o suprafaţă de 20 de hectare din care s-au obţinut 365 kg corn de secară.

În anul 1966 s-a inoculat o suprafaţă de 8 hectare la G.A.S. Zărneşti din care s-au obţinut 250 kg corn de secară şi 8 hectare la G.A.S. Vînători din care s-au obţinut 300 kg corn de secară.

— *În Regiunea Cluj*, Raionul Huedin, G.A.S. Aghireş în anul 1965 s-a infectat o suprafaţă de 2 hectare din care s-au obţinut 80 kg de corn de secară.

— *În Regiunea Suceava* Raionul Rădăuţi, Secţia Mitoc, în anul 1966 s-a inoculat o suprafaţă de 10 hectare dintre care : 3,5 hectare la Dorneşti şi 6,5 hectare la Negostina G.A.S., din care s-au obţinut 165 kg corn de secară.

— *Din Regiunea Banat*, Raionul Caransebeş, bazinul Brebu-Gărina am cercetat cornul de secară provenit din flora spontană.

Identificarea grupelor de alcaloizi din cornul de secară s-a făcut prin metoda cromatografică pe hîrtie [4], folosind ca probe etalon tartratul de ergotamină Merck, etansulfonatul de ergotoxină Richter şi maleatul de ergotamină Sandoz.

DETERMINĂRI CANTITATIVE

Tehnica de lucru : 15 g din fiecare sort de produs vegetal, corn de secară trecut prin sită (IV) degresat în prealabil cu eter de petrol, s-au tratat cu 150 ml eter etilic într-un balon cu dop rodat şi s-a lăsat 10 minute în repaus. S-a adăugat 1 g oxid de magneziu calcinat, triturat cu 30 ml apă, şi s-a agitat 3 ore. S-a adăugat 5 g tragacantă şi s-a lăsat în repaus pînă la separarea straturilor. Stratul eteric s-a agitat 5 minute cu sulfat de sodiu anhidru, s-a filtrat prin vată şi s-a completat cu eter etilic pînă la 150 ml.

[1] Infecţiile artificiale la Secale cereale au fost făcute sub îndrumarea unui grup de cercetători din Institutul pentru controlul de stat al medicamentului şi cercetări farmaceutice.

a) 100 ml soluţie eterică s-au întrebuinţat la determinarea conţinutului în alcaloizi totali;

b) 50 ml s-au folosit la determinarea conţinutului în alcaloizi levogiri în general şi a ergotaminei în special.

DETERMINAREA CONŢINUTULUI ÎN ALCALOIZI TOTALI

100 ml soluţie eterică, care corespund la 10 g pulbere de corn de secară, s-au extras de patru ori cu cîte 10 ml soluţie de acid tartric 1%, printr-o pîlnie de separare, agitînd de fiecare dată cîte 5 minute. Soluţiile apoase reunite s-au încălzit pe baia de apă la o temperatură sub 40° şi sub presiune redusă, pînă la îndepărtarea urmelor de eter. S-a filtrat într-un balon cotat de 50 ml şi s-a completat la semn cu soluţie de acid tartric 1%.

Doi ml soluţie s-au tratat cu 4 ml reactiv Allport [8], s-a agitat, iar după 5 minute s-au adăugat 0,004 g pirosulfit de sodiu. Extincţia s-a citit la fotocolorimetru Pulfrich, la lungimea de undă de 570 mμ, în cuve de 1 cm, faţă de o probă martor preparată în aceleaşi condiţii, din aceiaşi reactivi, înlocuind soluţia de analizat cu un volum egal de soluţie de acid tartric 1%. Concentraţia în alcaloizi s-a calculat cu ajutorul unei curbe etalon, stabilită în aceleaşi condiţii, cu tartrat de ergotamină Merck.

În cazul cînd soluţiile de analizat au avut o concentraţie în alcaloizi mai mare, ele au fost diluate pînă la limitele de concentraţie necesare.

DETERMINAREA CONŢINUTULUI ÎN ALCALOIZI LEVOGIRI, PRIN METODA CROMATOGRAFICĂ PE HÎRTIE

Fîşii de hîrtie Whatman nr. 1, late de 3 × 4 cm, lungi de 45 cm, cu linia de start trasată la 7 cm de capătul hîrtiei, au fost scufundate timp de cca 20 de secunde într-o soluţie preparată dizolvînd 2 g acid benzoic într-un amestec de 150 ml metanol şi 50 ml formamidă, după care metanolul a fost practic îndepărtat la temperatura camerei.

Din soluţia eterică a alcaloizilor totali extraşi din cornul secarei s-au micropipetat pe linia de start a benzilor de hîrtie cromatografică porţiuni corespunzătoare la 75 μg alcaloizi totali.

Irigarea s-a făcut timp de 3 ore în aparatul de cromatografie „Chropa", ferit de lumină direct pe cît posibil, pînă cînd frontul sistemului a ajuns la cca 35 cm depărtare de linia de start. Ca sistem am folosit un amestec de tetraclorură de carbon-cloroform-benzen (7 : 2 : 1).

Benzile de hîrtie au fost examinate în lumină ultravioletă, iar zonele fluorescente corespunzătoare alcaloizilor levogiri au fost conturate cu creionul şi decupate pe lăţimea întregii hîrtii. Unul din capetele benzii de hîrtie s-a tăiat zimţat, iar celălalt s-a introdus în cuva cu soluţie de 1% acid tartric. S-a lucrat într-un bac cu atmosferă saturată cu vapori de apă, iar după 24 de ore eluatele de cca 2—3 ml au fost colectate în eprubete gradate. Soluţiile au fost reunite şi completate cu apă la 6 ml. S-au luat 2 ml eluat, la care s-au adăugat 4 ml reactiv Allport, iar după 20 de minute s-a colorimetrat la fotocolorimetru, la lungimea de undă de 570 mμ, în cuva de 1 cm.

Concentraţia în alcaloizi levogiri s-a calculat cu ajutorul unei curbe etalon, stabilită în prealabil cu tartrat de ergotamină.

Determinarea conţinutului în ergotamină din cornul de secară s-a făcut tot cromatografic, procedîndu-se ca mai sus, spoturile corespunzătoare ergotaminei decupîndu-se pe lăţimea întregii hîrtii.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele cercetărilor noastre asupra cornului de secară provenit din diferite regiuni ale ţării şi din flora spontană sînt înregistrate în tabela 1, din care se desprind următoarele :

Pe teritoriul ţării noastre cornul de secară prezintă o compoziţie variată, atît după conţinutul în ergotamină (0,02 — 0,27%), cît şi după cel de alcaloizi levogiri (0,04 — 0,28%).

Cornul de secară recoltat din Regiunea Bucureşti, raionul Titu, comuna Corbii, G.A.S. Vînători, poate fi considerat ca selecţionat pentru grupa ergotaminei.

Produsul vegetal recoltat din celelalte regiuni ne-a indicat un amestec de alcaloizi din grupele ergotaminei şi ergotoxinei. Cornul de secară cu un conţinut mai ridicat în alcaloizi levogiri a fost acela recoltat din Regiunea Bacău, raionul Tg. Neamţ, G.A.S. Vînători.

Folosind metoda fotocolorimetrică cu reactivul Allport, metodă indicată şi în Farmacopeea Română ediţia a VIII-a, la dozarea directă a conţinutului în alcaloizi totali din cornul de secară, am obţinut valori mult mai mari decît în cazul cînd am separat mai întîi alcaloizii levogiri prin cromatografia pe hîrtie, i-am eluat cu solvent şi apoi i-am dozat fotocolorimetric cu reactivul Allport.

Valorile mult mai mari ale conţinutului în alcaloizi totali obţinute în primul caz sînt explicabile şi se datoresc faptului că reactivul Allport nu este specific alcaloizilor levogiri, întrucît reacţii de culoare cu acest reactiv sînt date şi de alcaloizii dextrogiri, precum şi de acizii lisergici, care pot fi găsiţi printre produşii de descompunere ai alcaloizilor, substanţe necunoscute.

Pe de altă parte se ştie că alcaloizii levogiri din cornul de secară sînt singurii puternic activi terapeutic. De aceea propunem ca la controlul calităţii cornului de secară şi a preparatelor sale medicamentoase, în vederea valorificării lor, să se aplice mai întîi cromatografia pe hîrtie pentru separarea şi identificarea alcaloizilor levogiri, singurii puternic activi terapeutic, urmată apoi, în cazul dozării acestora, de procedeul fotocolorimetric cu reactivul Allport.

CONCLUZII

Cercetările asupra cornului de secară obţinut din culturi în diferite regiuni ale ţării şi din flora spontană, în vederea găsirii unei materii prime selecţionate pe grupe de alcaloizi, constantă ca valoare terapeutică şi cu un conţinut cît mai bogat în alcaloizi levogiri ne-au condus la următoarele concluzii :

Pe teritoriul ţării noastre cornul de secară are o compoziţie variată, atît după conţinutul în ergotamină (0,02 — 0,27%) cît şi după conţinutul în alcaloizi levogiri (0,04 — 0,28%) exprimate în tartrat de ergotamină.

Cornul de secară recoltat din Regiunea Bucureşti, raionul Titu, comuna Corbii, G.A.S. Vînători poate fi selecţionat pentru grupa ergotaminei ; cu conţinutul cel mai ridicat în alcaloizi levogiri s-a dovedit acela provenit din Regiunea Bacău, raion Tg. Neamţ, G.A.S. Vînători.

Tabela 1

Determinarea cantitativă* şi calitativă a alcaloizilor din cornul de secară obţinut din diferite regiuni ale ţării**

Localitatea	Anul de cultură	Suprafaţa infectată (ha)	Cantitatea produsă (kg)*	Alcaloizi totali (g%)	Alcaloizi levogiri (g%)	Ergotamină (g%)	Examen cromatografic		
							grupa ergotaminei	grupa ergotoxinei	grupa ergometrinei
Reg. Bucureşti raion Titu com. Corbii G.A.S. Vînători	1965	25	500	0,32	0,27	0,27	ergotamina	—	—
Reg. Bucureşti com. Slobozia G.A.S.	1966	25	700	0,17	0,08	0,08	ergotamina ergotaminina	alc. (+)**	—
Reg. Oltenia raion Calafat com. Calafat G.A.S.	1965	26	403	0,22	0,16	0,10	ergotamina	alc. (—) şi urme de alc. (+)	—
Reg. Oltenia în dif. terenuri experimentale	1966	35	280	0,23	0,17	0,13	ergotamina	alc. (—) şi urme de alc. (+)	—
Reg. Bacău raion Tg. Neamţ G.A.S. Vînători	1965	20	365	0,23	0,12	0,12	ergotamina	alc. (—) şi urme de alc. (+)	—
Reg. Bacău raion Tg. Neamţ în dif. terenuri experimentale	1966	16	550	0,23	0,12	0,12	egrotamina	alc. (+)	—
Reg. Cluj raion Huedin G.A.S. Aghireş	1965	2	80	0,27	0,21	0,17	ergotamina	alc. (—) şi urme de alc. (+)	—
Reg. Suceava raion Rădăuţi Secţia Mitoc	1966	10	165	0,30	0,23	0,18	ergotamina	alc. (+)	—
Reg. Banat raion Caransebeş bazinul Brebu-Gărina, din flora spontană	1965	—	—	0,06	0,04	0,02	ergotamina	alc. (—) alc. (+)	ergometrina

* uscat la aer.

** alc. (+) = alcaloizi dextrogiri; alc. (—) = alcaloizi levogiri.

*** conţinutul de alcaloizi s-a exprimat în tartrat de ergotamină.

La controlul calităţii cornului de secară este necesar să se aplice mai întîi cromatografia pe hîrtie, urmată, în cazul dozării alcaloizilor levogiri, de procedeul fotocolorimetric cu reactivul Allport.

Prezentată la redacţie la 24 mai 1967

Facultatea de farmacie
I.M.F. Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bojor O., Dragomirescu-Manuchian Maria, *Noi consideraţii asupra problemei cornului de secară obţinut în R.P.R.*, Farmacia (Bucureşti) **7**, 217 (1959).
2. Constantinescu D. Gr., Bojor O., Manuchian-Dragomirescu Maria, Platon Florentina, Pavel Margareta, Grinţescu A., Georgescu Viorica, Farmacia (Bucureşti), **11**, 285 (1963).
3. Hauschild F., *Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie*, Georg Thieme, Leipzig, 1961, 608.
4. Pöhm M., *Ein Verfahren zur Trennung und Bestimmung der Mutterkornalkaloide mittels Papierchromatographie*, Arch. Pharmazie, **2**, 468 (1958).
5. Săvulescu Alice, Bojor O., Becerescu D., Ştefănescu A., Coiciu Evdochia, Puşcaşu A., Vasiliu Rodica, *Producerea cornului de secară prin infecţii artificiale. Ştiinţa în sprijinul producţiei. Recomandări pentru producţie în cultura plantelor de cimp*, Edit. agrosilvică, Bucureşti, 1960, 19–23.
6. Săvulescu Alice, Bojor O., Becerescu D., Ştefănescu A., Coiciu Evdochia, Puşcaşu A. şi Vasiliu Rodica, *Metoda producerii cornului secarii prin infecţii artificiale. Metode agrotehnice pentru sporirea producţiei agricole în sud-estul Transilvaniei*, Edit. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1960, 191–193.
7. Săvulescu Alice, Coiciu Evdochia, Becerescu D., Ştefănescu A., Puşcaşu A., Moga Rodica, Bojor O., Dragomirescu-Manuchian Maria, Platon Florentina, *Cercetări asupra producerii cornului de secară în R.P.R.*, St. cerc. biol., Seria biol. vegetală, **13**, 149 (1961).
8. Silber A., Schulze T., *Alkaloidbestimmungen im Mutterkorn*, Pharmazie, **8**, 675 (1953).
9. Teitel A., Bojor O., *Contribuţii la studiul infectării artificiale a secarei cu Claviceps purpurea Tulsane*, Farmacia (Bucureşti), **2**, 22 (1954).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 4, 325 – 332 (1967)

UTILIZAREA CROMATOGRAFIEI DE EXCLUDERE MOLECULARĂ LA IZOLAREA ŞI PURIFICAREA ANTICORPILOR DIN PRECIPITATELE IMUNE FLUORESCENTE

VICTOR GHEŢIE, SILVIA MIHĂESCU şi LUCIA BUZILĂ

576.8.097

Rezumat. – Filtrarea pe Sephadex G–200, cu tampon glicocol pH = 1,8, a complexului imun albumină serică umană – anticorpi de iepure antialbumină permite separarea satisfăcătoare a anticorpilor de antigen.
Procentul de albumină ce impurifică fracţiunea anticorpilor este de 4%. Prin recromatografiere sau ridicarea pH-ului, impurificarea prin albumină se reduce la 0,6%.

Metodele imunochimice specifice de preparare a anticorpilor puri se desfăşoară în trei etape: 1) formarea precipitatului antigen-anticorp şi separarea lui; 2) disocierea complexului antigen-anticorp; 3) separarea anticorpului de antigen. Ultima etapă este aproape întotdeauna parcursă de dificultăţi experimentale; separarea satisfăcătoare a anticorpului de antigen se realizează numai dacă aceste două substanţe proteice au proprietăţi fizico-chimice şi chimice net deosebite. De aceea, metodele de separare găsite în literatură sînt mai mult sau mai puţin particulare complexului imun luat în studiu.

Dacă antigenul se deosebeşte de anticorp prin greutatea moleculară, separarea poate fi realizată cu ajutorul cromatografiei de excludere moleculară pe gel de Sephadex. Prima separare de acest tip a fost aplicată cu succes de Givol şi colab. [1] în 1962, la sistemul lizozim (G.M. = 14 000) – anticorpi de iepure antilizozim (G.M. = 160 000), folosind Sephadex G–75, echilibrat şi eluat cu o soluţie de pH = 1,8. Preparatul de anticorpi obţinut era impurificat cu o cantitate neînsemnată de antigen (sub 0,1%). Recent, Tarkhanova [2] a demonstrat eficienţa metodei cromatografice, utilizînd Sephadex G–200 la separarea ovalbuminei (G.M. = 44 000) de anticorpii de iepure corespondenţi (G.M. = 160 000).

Cromatografia de excludere moleculară a fost folosită de asemenea la separarea complexelor imune solubile de excesul reactanţilor [3], precum şi la studierea interacţiunii dintre antigen şi anticorp [4].

Aceste cercetări au arătat că cromatografia pe geluri de Sephadex este o tehnică eficientă de izolare a anticorpilor puri, cu condiţia ca greutatea moleculară a antigenului să fie de cîteva ori mai mică decît a anticorpilor.

Pentru a stabili limita de eficiență a acestei tehnici în raport cu greutatea moleculară a antigenului, ne-am propus să realizăm separarea albuminei serice umane de anticorpii de iepure corespondenți. Ne-am oprit la acest antigen, deoarece greutatea moleculară a albuminei serice umane este aproape jumătate din aceea a anticorpilor de iepure (G.M. = 68 000) și deoarece preparatele de albumină conțin în mod obișnuit dimeri, trimeri și chiar polimeri [5], ceea ce micșorează și mai mult diferența dintre greutățile moleculare ale reactanților.

Trebuie să precizăm că separarea albuminei serice de anticorpii specifici nu este posibilă prin tehnicile de precipitare fracționată cu sulfat de amoniu, indicate în literatură [6]. La pH-urile acide la care se face disociația complexului imun, sulfatul de amoniu, chiar în concentrație de 33%, precipită și albumina. Neutralizarea amestecului produce dizolvarea albuminei, anticorpii rămînînd precipitați, însă ridicarea pH-ului determină recombinarea albuminei cu anticorpii și formarea precipitatului imun. Formarea precipitatului imun are loc concomitent cu dizolvarea albuminei, astfel că, după neutralizarea soluției, anticorpii din precipitat se găsesc în cea mai mare parte legați de antigen : randamentul cu care se obțin anticorpii puri prin acest procedeu îl face complet neutralizabil în scopuri preparative. Aceste rezultate, obținute de noi într-o cercetare preliminară, ne-au întărit convingerea că cromatografia pe Sephadex G-200 rămîne singura utilizabilă pentru modelul nostru experimental.

Pentru a putea determina unii parametri suplimentari, ca : randamentul disociației, procentul de albumină din complexele imune și din anticorpii izolați etc., am marcat albumina cu clorura acidului 1-dimetilamino-naftalen-5-sulfonic (DANSIL) și am urmărit și măsurat și fluorescența preparatelor.

MATERIAL ȘI METODE

Antigene. S-au folosit două feluri de albumine serice umane : una, preparată de noi prin tehnica S. Michael [7], cunoscută ca determinînd polimerizarea albuminei [8], și de care s-a legat DANSIL prin tehnicile uzuale de fluorocromare [9]. Cealaltă, produsă de firma Behringwerke, are un conținut ridicat de albumină monomer.

Antiseruri. Serul de iepure antialbumină umană s-a preparat după o schemă arătată în altă lucrare [10]. Serul de cobai anti γ G de iepure s-a obținut după o schemă de imunizare indicată, de asemenea, în altă parte [11].

Obținerea precipitatelor imune. S-au construit curbele de precipitare, folosind — pentru măsurarea cantității precipitatului imun — o metodă turbidimetrică [12].

S-a determinat cantitatea optimă de antigen și s-a obținut cca 1 g de complex imun printr-o precipitare efectuată la echivalență.

Disocierea complexului imun. Tamponul glicocol pH = 1,8, 0,1M a fost ales dintr-un număr de 6 soluții acide întrebuințate uzual pentru disociația complexelor imune, deoarece producea cea mai mare disociație a complexului imun și cea mai mică inactivare a anticorpilor.

Dozarea anticorpilor. Determinarea cantității de anticorpi existentă în diferite preparate s-a făcut cu ajutorul imunosorbenților, folosind tehnica recomandată de Gurvici [13]. Ca imunosorbent s-a folosit m-aminobenziloximetil-celuloza (MABOM—celuloza), de care s-a fixat albumina umană. Capacitatea de fixare a imunosorbentului a fost în jur de 40 mg albumină/g imunosorbent.

Cromatografia pe Sephadex G—200. S-au folosit coloane de 2,8/60 cm și 2,8/90 cm. Echilibrarea și eluția s-au făcut cu tampon glicocol 0,1 M, pH = 1,8. Viteza de curgere a fost de

15—25 ml/oră. S-au colectat fracţiuni de 5 ml. Fiecare fracţiune s-a măsurat la 280 mμ (d = 0,5cm) pentru proteine, respectiv la 320 mμ (d = 1 cm) şi la ultramicrofluorometru (Shimadzu Kotaki, Japan[1]) pentru DANSIL. Din valorile citite s-au calculat raporturile $R = E^{1\,cm}_{320}/E^{0,5\,cm}_{280}$ şi $F/E^{0,5}_{280}$, unde: F = fluorescenţa în unităţi arbitrare, măsurate la ultramicrofluorometru. Calcularea procentelor de albumină care impurifică diferitele fracţiuni cromatografice s-a făcut introducînd raporturile extincţiilor (R) în curbe etalon construite în coordonate R şi % din albumina fluorescentă.

Imunoelectroforeza. Electroforeza s-a efectuat în tampon veronal-veronal sodic, pH = 8,6, μ = 0,05 în cuvă şi 0,016 în plăci. Tensiunea a fost de 10 V/cm, iar durata migrării 2—3 ore. Prelucrarea plăcilor şi coloraţiile s-au făcut după tehnicile uzuale. Dubla difuzie s-a efectuat după Ouchterlony.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza cromatografică pe Sephadex G—200 a albuminei umane fluorescente, preparate în laboratorul nostru, şi a albuminei umane Behringwerke, nefluorescente, relevă deosebiri marcate între cele două proteine (fig. 1).

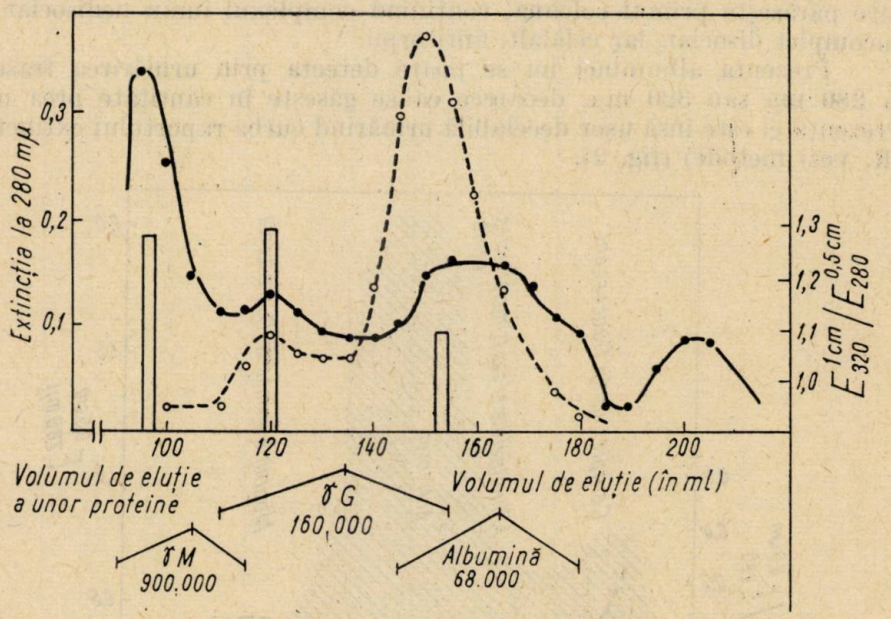


Fig. 1. — Analiza cromatografică pe Sephadex G—200 a albuminei umane.

——— Albumină fluorescentă preparată după tehnica S. Michael

—·—·— Albumină Behringwerke A.G.

Prin coloane s-a indicat raportul extincţiilor: E_{320}/E_{280}

Albumina preparată de noi pare a fi alcătuită din cel puţin 3 componente. După volumul lor de eluţie, componentele par a fi — în ordinea în care părăsesc coloana: albumina polimerizată, albumina dimer sau

[1] Mulţumim lui G. Haralambie, şeful Laboratorului de biochimie al Centrului Sportiv 23 August, pentru aparatul pus la dispoziţia noastră.

trimer şi albumina monomer. Albumina polimerizată poate atinge o greutate moleculară în jur de 900 000, ea părăsind coloana deodată cu γ M-globulina. Albuminad imerizată sau trimerizată are o greutate moleculară apropiată de cea a γ G-globulinelor de iepure, aşa cum se vede şi din figură. Eterogenitatea manifestă a preparatului nostru nu este surprinzătoare : este cunoscut faptul că albumina preparată după S. Michael determină polimerizarea monomerului [8], şi tocmai această polimerizare am urmărit să o realizăm. Prin contrast, se observă că albumina Behringwerke este alcătuită în principal din monomer, dimerul sau trimerul nefiind decît în cantităţi reduse. Este de observat că eterogenitatea semnalată la ambele preparate de albumină nu este cauzată de eventuale impurităţi, deoarece prin electroforeză şi imunoelectroforeză preparatele analizate s-au dovedit a fi omogene : un singur spot la electroforeză şi o singură linie de precipitare la imunoelectroforeză. Prezenţa polimerilor se reflectă, în imaginea imunoelectroforetică, prin întinderea liniei de precipitare pînă în zona startului.

Analiza cromatografică a complexului imun albumină-anticorpi antialbumină relevă două piscuri principale (la 280 mμ) : unul, mai mic, care părăseşte primul coloana, conţinînd complexul imun nedisociat sau incomplet disociat, iar celălalt, anticorpii.

Prezenţa albuminei nu se poate detecta prin urmărirea traseului la 280 mμ sau 320 mμ, deoarece ea se găseşte în cantitate prea mică. Prezenţa ei este însă uşor decelabilă urmărind curba raportului extincţiilor (R, vezi metode) (fig. 2).

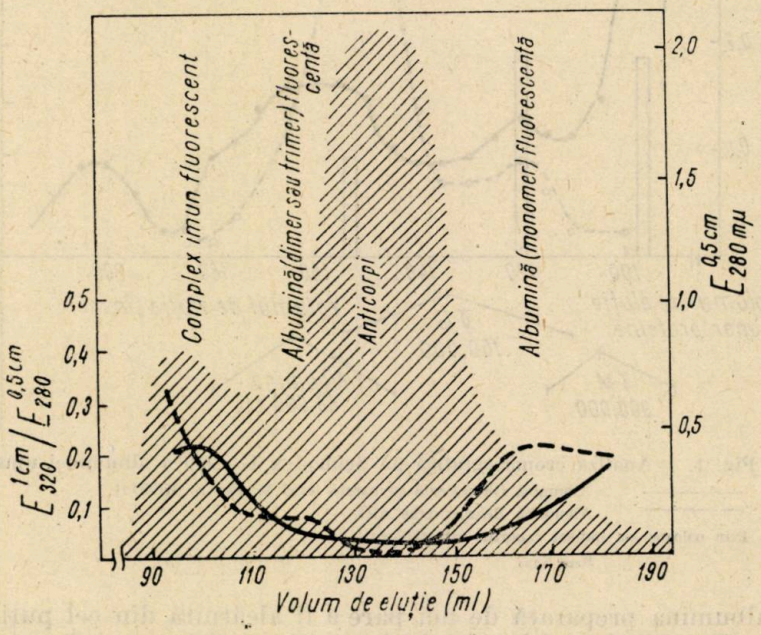


Fig. 2. — Analiza cromatografică a complexului imun albumină fluorescentă — anticorpi antialbumină.

———— Raportul extincţiilor (R) pentru complexul imun.

— — — — Raportul extincţiilor (R) pentru complexul imun cu adaos de albumină fluorescentă.

Profilul haşurat a fost obţinut prin citirea probelor la 280 mμ.

Cele două maxime de la începutul și sfîrșitul eluției indică prezența albuminei legate în complex (primul maxim) și a albuminei libere (al doilea maxim). Această constatare a fost întărită efectuînd cromatografia complexului imun la care s-a adăugat un supliment de albumină fluorescentă. Se observă că în regiunile extreme se produce o creștere a raportului R, ceea ce arată că în aceste zone se găsește surplusul de albumină. Apare totodată o tendință de creștere în zona 110—130 ml, ceea ce arată că aici poate să apară albumina dimer sau trimer. La ambele curbe, în regiunea centrală se constată o depresiune, ceea ce sugerează că în zona în care se eluează anticorpii se eluează cantități neînsemnate de albumină.

Această ultimă constatare este importantă în vederea utilizării metodei de cromatografie în scopuri preparative, de aceea am supus-o unei noi verificări, folosind coloane cu dimensiuni mai mari.

Rezultatul unei analize cromatografice tipice este reprezentat în figura 3.

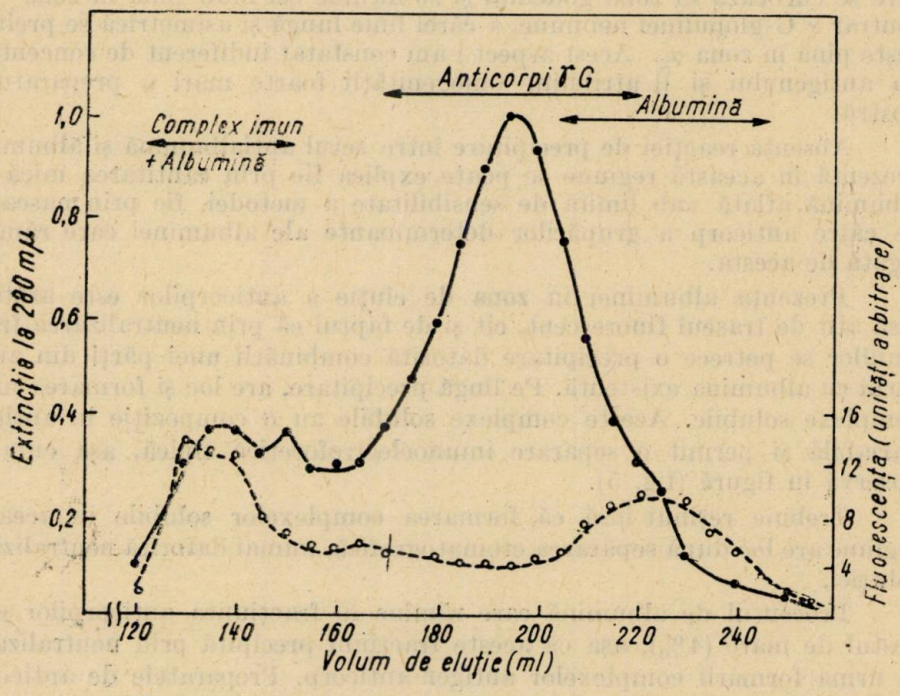


Fig. 3. — Separarea cromatografică a anticorpilor γG-antialbumină de albumină și de complexul imun nedisociat.

———— Extincția la 280 mμ.

— — — — Fluorescența (unității arbitrare).

Și în acest caz se observă că detectarea albuminei fluorescente monomere se poate face numai prin măsurarea fluorescenței probelor, și nu prin urmărirea traseului curbei citite la 280 mμ. În primele două piscuri se găsesc : complexul imun solubil fluorescent și albumina polimerizată. În piscul care reprezintă majoritatea proteinelor se găsesc anticorpii

impurificaţi — înspre cele două extremităţi — cu complexul imun solubil, respectiv albumina monomeră.

Aceste constatări au fost integral verificate supunînd fiecare fracţiune colectată, după neutralizare şi centrifugare, analizei prin imunodifuzie. S-a constatat că în primele două piscuri mai mici se detectează atît albumina polimerizată liberă cît şi albumina legată în complexul imun: această constatare se bazează pe faptul că unele fracţiuni din aceste piscuri reacţionează atît cu serul antialbumină cît şi cu cel anti γ G-globulină, iar altele reacţionează numai cu serul antialbumină.

În zona piscului majoritar se pune în evidenţă o reacţie numai cu serul anti γ G-globulină, ceea ce arată că în această regiune se găsesc în principal anticorpii (fig. 4).

Preparatele de anticorp obţinute au un aspect imunoelectroforetic caracteristic (fig. 4). Forma liniei de precipitare şi poziţia ei diferă de cea a γ G-globulinei neimune de iepure. Linia se înscrie pe un arc de cerc simetric, care se curbează în zona godeului şi se întinde cel mult pînă în zona β_1, contrar γ G-globulinei neimune, a cărei linie lungă şi asimetrică se prelungeşte pînă în zona α_2. Acest aspect l-am constatat indiferent de concentraţia antigenului şi îl atribuim omogenităţii foarte mari a preparatului nostru.

Absenţa reacţiei de precipitare între serul antialbumină şi albumina prezentă în această regiune se poate explica fie prin cantitatea mică de albumină, aflată sub limita de sensibilitate a metodei, fie prin mascarea de către anticorp a grupărilor determinante ale albuminei care rămîne legată de acesta.

Prezenţa albuminei în zona de eluţie a anticorpilor este arătată însă atît de traseul fluorescent, cît şi de faptul că prin neutralizarea fracţiunilor se petrece o precipitare datorită combinării unei părţi din anticorpi cu albumina existentă. Pe lîngă precipitare, are loc şi formarea unor complexe solubile. Aceste complexe solubile au o compoziţie în antigen variabilă şi permit o separare imunoelectroforetică tipică, aşa cum se observă în figură (fig. 5).

Trebuie reţinut însă că formarea complexelor solubile în această regiune are loc după separarea cromatografică, numai datorită neutralizării soluţiei.

Procentul de albumină care rămîne în fracţiunea anticorpilor este destul de mare (4%), aşa că aceste fracţiuni precipită prin neutralizare, în urma formării complexelor antigen-anticorp. Preparatele de anticorpi obţinute după îndepărtarea complexului imun insolubil conţin o cantitate neînsemnată de albumină (cca 0,6 %).

Complexele formate micşorează însă randamentul preparării anticorpilor şi fac ca recuperarea anticorpilor din coloană să nu depăşească 25%. Cauzele acestui randament relativ scăzut trebuie căutate în disociaţia incompletă a complexului imun (cu tamponul folosit se disociază numai 75% din anticorpii participanţi) şi în separarea incompletă a albuminei de anticorpi, ceea ce face ca în zona lor de contact să se piardă aproape jumătate din cantitatea de anticorpi separaţi, în urma recombinării lor

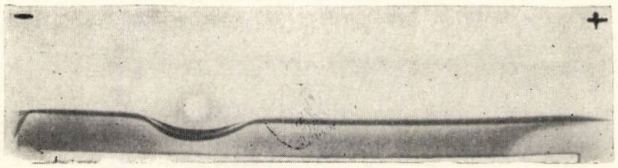


Fig. 4. — Analiza imunoelectroforetică a anticorpilor γ G antialbumină, separați prin filtrare pe Sephadex G—200. În godeu s-a aplicat o fracțiune din piscul anticorpilor γ G antialbumină, în șanțul inferior ser de cobai anti γ G de iepure, iar în șanțul superior ser de iepure.

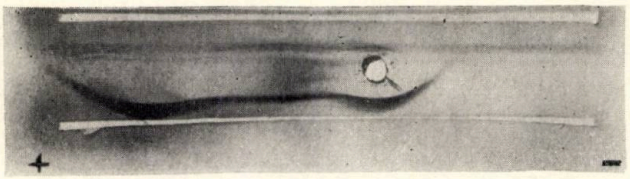


Fig. 5. — Analiza imunoelectroforetică a complexului imun solubil albumină — antialbumină. În godeu s-a aplicat o fracțiune din zona cromatografică cuprinsă între piscurile anticorpilor și albuminei. În șanțul inferior s-a introdus ser de cobai anti γG de iepure, iar în șanțul superior ser de iepure antialbumină umană.

cu antigenul corespondent. Această situaţie poate fi parţial remediată recromatografiind fracţiunea anticorpilor, ceea ce permite îndepărtarea unei cantităţi de albumină şi îmbunătăţirea randamentului.

Este de notat că prezenţa polimerilor albuminei poate fi şi ea un factor de micşorare a randamentului. Această posibilitate se referă în special la dimer şi trimer, care părăsesc coloana în frontul anticorpilor. Totuşi, în această porţiune noi nu am putut semnala prezenţa albuminei libere, ceea ce arată că s-ar putea ca, la formarea complexului imun, dimerul şi trimerul să fie eliminaţi din competiţia pentru anticorp de către monomer. Această posibilitate este interesantă din punctul de vedere al reacţiei imune, de aceea o reţinem pentru viitor.

Din γ G-globulinele existente în preparatul nostru, peste 80% sînt capabile să se combine cu albumina cuplată de imunosorbent, dovedind că în cursul manipulărilor s-a inactivat o cantitate rezonabilă de anticorpi.

CONCLUZII

Rezultatele prezentate conduc la concluzia că tehnica cromatografiei de excludere poate fi folosită şi la separarea anticorpilor de antigenele cu o greutate moleculară de două ori mai mică decît a anticorpilor.

Interferenţa volumelor de eluţie determină micşorarea randamentului, dar nu împiedică obţinerea anticorpilor puri într-un procent care permite aplicarea tehnicii pe scară preparativă.

Prezentată la redacţie la 4 aprilie, 1967

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. D. Givol, S. Fuchs, M. Sela, *Isolation of antibodies to antigens of low molecular weight*, Biochim. Biophys. Acta, **63**, 222 (1962).
2. I. A. Tarkhanova, *Use of chromatography on Sephadex G—200 for the isolation of antibodies for a specific precipitate*, Vopr. Med. Himii, **12**, 108 (1966); B. A. 47, 103406 (1966).
3. A. R. Boyns, J. Hardwicke, *The isolation of soluble antigen-antibody complexes on Sephadex G—200*, Immunology, **10**, 57 (1966).
4. E. Haber, L. B. Page, F. F. Richards, *Radioimmunoassay employing gel filtration*, Analyt. Biochem., **12**, 163 (1965).
5. H. E. Schultze, J. F. Heremans, *Molecular biology of human proteins*, Elsevier, Amsterdam, 1966, vol. I, p. 407.
6. V. Gheţie, V. Micuşan, *Analiza imunochimică*, Edit. Academiei R.S. România, Bucureşti, 1966, p. 239—241.
7. S. E. Michael, *The isolation of albumin from blood serum or plasma by means of organic solvents*, Biochem. J., **82**, 212 (1962).
8. L. Sherman, *The vallance Owen („Sinalbumin") insulin antagonist. Reproductibility and reliability of results in nondiabetic and diabetic humans*, Diabetes, **15**, 149 (1966).

9. H. D. SCHELL, V. GHEȚIE, *Die Fluoreszenzmarkierung der Serumeiweisstoffe mit 1-dimethylamino-naphthalin-5-Sulfonsäurechlorid und Reinigung der erhaltenen Konjugate*, Rev. roum. Biochim., **1**, 203 (1964).

10. V. GHEȚIE, *Fluoroimunoelectroforeza*, St. cerc. biochim., **9**, 359 (1966).

11. S. MIHĂESCU, V. GHEȚIE, *Variații individuale în producerea anticorpilor precipitanți la cobaii inoculați cu γ G-globulină sau proteine serice de iepure. Studiu imunoelectroforetic*, St. cerc. biochim., **10**, 273 (1967).

12. V. GHEȚIE, V. MICUȘAN, *Analiza imunochimică*, Ed. Academiei R.S. România, București, 1966, p. 233.

13. A. E. GURVICI, *The use of antigens on an insoluble support*, în *Immunological methods*, sub red. J. F. ACKROYAT, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1964, p. 113.

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 4, 333–335 (1967)

CONTRIBUŢII LA STUDIUL FIBRINOGENULUI CU METODA POLAROGRAFICĂ ÎN BOLILE REUMATISMALE

ÉVA KÓTAY LAKATOS, E. KIFOR şi OLGA KIFOR

Rezumat.-Autorii au studiat comportarea polarografică a soluţiilor de fibrinogen provenit de la 30 de bolnavi de poliartrită cronică evolutivă şi de la 50 de indivizi sănătoşi. S-a pus în evidenţă o diferenţă statistic semnificativă între înălţimea undelor, observîndu-se o deviere înspre valori mai scăzute în cazul bolnavilor (valoarea medie la bolnavi 48,2 mm, iar la sănătoşi 60,4 mm).
Determinînd şi conţinutul glucidic şi protidic al fibrinogenului, s-a constatat că componentul glucidic la bolnavi este mai mare decît la sănătoşi (valoarea medie la bolnavi : 9,08 mg %, la sănătoşi : 6,47 mg %). Componentul tirozinic nu a prezentat diferenţe semnificative.

Studiind fibrinoliza spontană a sîngelui în bolile reumatice, problemă de altfel abordată şi de alţi autori [2], [3], [5], [6], [9], [10], am făcut o serie de observaţii [8] pentru interpretarea cărora am presupus că, pe lîngă alţi factori, ar fi posîbilă şi intervenţia unei modificări a fibrinogenului în aceste boli. Pentru verificarea ipotezei am studiat fibrinogenul din mai multe puncte de vedere, constatînd că în cazul bolilor reumatice componentul glucidic al fibrinogenului este crescut [7], rezultat care concordă cu datele publicate de Stoichiţă şi colab. [12].

În lucrarea de faţă vom prezenta rezultatele noastre cu privire la deosebirile calitative dintre fibrinogenul provenit de la 50 de sănătoşi şi cel provenit de la 30 de bolnavi de poliartrită cronică evolutivă (PCE), urmărindu-le atît prin determinarea componentului glucidic şi a celui protidic, cît şi prin determinarea undei polarografice a fibrinogenului izolat.

METODA DE LUCRU

Am determinat componentul glucidic cu antronă, cu ajutorul metodei lui Graff [11], modificată de noi pentru determinarea fibrinogenului [7]. Componentul protidic l-am determinat cu metoda Folin-Ciocîlteu [4], iar unda polarografică a fibrinogenului izolat în soluţie tamponată de Co^{III}, la 50 de sănătoşi şi 30 de bolnavi de poliartrită cronică evolutivă.

Prepararea fibrinogenului din plasmă oxalatată 1 : 10 a fost efectuată prin precipitare cu sulfat de sodiu, a cărui concentraţie finală a fost de 10,6% (metoda Podmore-Vincent). Fibrinogenul precipitat şi spălat cu soluţie de sulfat de sodiu 10,6% a fost redizolvat la volumul iniţial al plasmei, folosind soluţie 0,9% de clorură de sodiu. Soluţiile de fibrinogen au fost

aduse la o concentraţie de 100 mg/100 ml, controlată cu metoda biuretului. În această soluţie s-a dozat componentul glucidic şi cel protidic, determinîndu-se şi unda polarografică, folosind pentru acest scop o soluţie de Co^{III} tamponată (Brdicka, [1]). În 4 ml soluţie de Co^{III} s-a dizolvat 0,1 ml soluţie de fibrinogen, măsurînd unda cu o sensibilitate de 1/300, la o tensiune de 1,2 — 1,55 mV.

REZULTATE

Componentul glucidic al fibrinogenului a fost şi în această experienţă mai mare la bolnavi, valoarea medie fiind de 9,08 mg %, faţă de 6,47 mg % la sănătoşi. Diferenţa dintre aceste două valori medii este statistic foarte bine asigurată ($p < 0,1$).

Valoarea medie a conţinutului în tirozină este aceeaşi la bolnavi (27,5%) ca şi la sănătoşi (27,6 %). Raportul tirozină/glucide este 3,02 în cazul bolnavilor şi 4,26 în cazul grupei de sănătoşi.

În privinţa undei polarografice, am constatat că înălţimea undelor variază între 52 şi 67 mm în cazul sănătoşilor, cu o frecvenţă maximă între 56 şi 63 mm. La bolnavii supuşi examinării am constatat în 47,1% din cazuri o scădere a înălţimii undelor, valorile limită fiind între 36 şi 51 mm, cu o frecvenţă maximă între 44 şi 47 mm. Totodată am constatat că o parte din rezultate coincid cu cele de la normali, iar o altă parte (11,8%) sînt mai crescute faţă de valorile normale (fig. 1). Valoarea medie în cazul bolnavilor este 48,2 mm, iar la sănătoşi 60,4 mm. Diferenţa dintre aceste două valori medii este statistic foarte bine asigurată ($p < 0,1$).

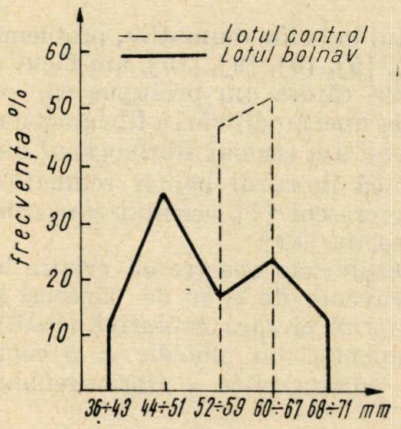


Fig. 1. — Variaţia înălţimii undei polarografice la sănătoşi şi bolnavi de poliartrită cronică evolutivă.

Am încercat să căutăm o corelaţie între creşterea conţinutului glucidic al fibrinogenului şi înălţimea undelor, care însă nu am putut-o găsi, valoarea coeficientului de corelaţie fiind la lotul control de 0,285, la lotul de bolnavi 0,381.

CONCLUZII

Fibrinogenul provenit de la bolnavi cu PCE diferă de al celor sănătoşi. Această deosebire este mai evidentă în privinţa conţinutului glucidic al fibrinogenului. Se pare că o consecinţă a acestui fenomen este şi faptul dispersiunii undei polarografice faţă de comportarea normală, observîndu-se şi o deviere înspre valori mai scăzute.

Se mai desprinde o sugestie : se poate presupune că la etiopatogenia unor boli reumatice (PCE) contribuie şi o alterare congenitală sau cîştigată a compoziţiei fibrinogenului.

Prezentată la redacţie la 16 mai 1967 *Clinica medicală nr. 1 Tîrgu-Mureş*

BIBLIOGRAFIE

1. Brezina M., Zuman P., *Die Polarographie in der Medizin, Biochemie u. Pharmazie*, Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1956.
2. Chakrabarti R., Fearnley G. R., Hocking Elisabeth D., Brit. med. J., *1*, 534 (1964).
3. Fearnley G. R., Chakrabarti R., Hocking Elisabeth D., Lancet, *1*, 9—13 (1965).
4. Georgescu P., Păunescu E., *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Edit. medicală, Bucureşti, 1960.
5. Goryachkin Ya. K., Terap. Arhiv, Kuibyshev, **36**, 7—10 (1964).
6. Kopec M., Amatuni H., Pol. Tyg. Lek., **16**, *34*, 1301—1304 (1961).
7. Kótay Lakatos É., Kifor E., Fall A., Rev. Med., Tîrgu-Mureş, *2*, 176 (1964).
8. Lakatos É., Rev. Med., Tîrgu-Mureş, *4*, 479 (1962).
9. Moga A., Cucuianu M., Pitea P., Macavei E., St. cerc. Med. Int., Cluj, **XII**, *1*, 93 (1961).
10. Moga A., Cucuianu M., Missits P., Med. int., **XII**, 505 (1960).
11. Richter A., *A mozgásszervi megbetegedések*, Edit. Tud. és Ismeretterjesztö, Budapesta, 1956.
12. Stoichiţa Michaela, Ciobanu V., Ţeican-Gheorghiu M., Vlădescu C., St. cerc. Med. int., *1*, 97 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., **10**, *4*, 337–340, (1967)

NATURA LEGĂTURILOR ÎN COMPLECȘII FORMAȚI ÎNTRE PROTEINE ȘI SĂRURILE CUATERNARE DE AMONIU

HORST D. SCHELL

Rezumat. — Prin interacțiunea proteinelor serice, musculare și cerebrale cu săruri cuaternare de amoniu fluorescente, derivate de la stilben, de tipul clorurilor de 4-dimetil-alchil-amoniu-stilben, rezultă — cum s-a arătat în lucrări anterioare — complecși fluorescenți insolubili sau solubili, după cum concentrația sării cuaternare de amoniu adăugate a fost mai mică sau mai mare. Cercetînd în lucrarea de față natura legăturilor care se realizează între proteinele de diferite origini și sărurile cuaternare de amoniu, s-a putut arăta că complecșii insolubili iau naștere prin legături de tip salin. Complecșii solubili, în schimb, se formează prin legături de tip Van der Waals: moleculele sării cuaternare aflate în exces se leagă prin grupările lor lipofile de grupările lipofile de pe suprafața complexului insolubil, îndreptîndu-și grupările lor acvofile în afară, spre faza apoasă, ceea ce duce la formarea complecșilor solubili.

Un rol hotărîtor în formarea complecșilor revine pe lîngă grupării cuaternare de amoniu, mai ales părții lipofile din molecula sării cuaternare de amoniu.

Cercetînd în lucrări anterioare interacțiunea proteinelor serice [1], musculare [2] și cerebrale [3] cu unele săruri cuaternare de amoniu fluorescente, derivate de la stilben [4], în vederea lămuririi unor aspecte legate de vehicularea în sînge și localizarea în organism a acestora, am constatat că o parte din sărurile studiate formează complecși cu anumite fracțiuni proteice. Am observat, totodată, că sărurile care formează acești complecși prezintă un grad mai pronunțat de lipofilie decît cele care nu reacționează cu proteinele și se deosebesc de ele prin mecanismul lor de acțiune în producerea blocării transmisiei neuromusculare [5].

Natura complecșilor rezultați depinde de concentrația soluției sării cuaternare de amoniu adăugate serului sanguin sau extractului proteic muscular sau cerebral. Astfel, la concentrații în jur de 1% se formează complecși insolubili care se depun sub formă de flocoane, iar la concentrații mai mari, complecși solubili care rămîn în soluție.

În lucrarea de față am studiat natura legăturilor ce se stabilesc între proteine și sărurile cuaternare de amoniu în acești complecși, folosind sărurile cuaternare de amoniu fluorescente, derivate de la stilben, drept substanțe marcate.

Prin tratarea serului sanguin sau a extractelor proteice din mușchi sau creier cu o soluție 1—2% de clorură de 4-dimetil-alchil-amoniu-stilben, se formează, chiar din primele momente, flocoane fine care se depun cu

timpul. Aceste flocoane, purificate prin repetate spălări şi centrifugări, se colorează intens cu albastrul de bromfenol, ceea ce denotă natura lor proteică şi prezintă în lumina ultravioletă o puternică fluorescenţă albastră, similară cu cea a sării cuaternare de amoniu adăugate. Înseamnă

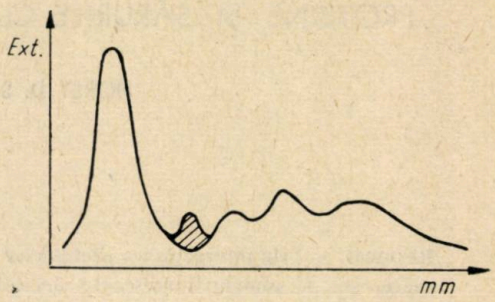


Fig. 1. — Electroforegrama serului sanguin de om.

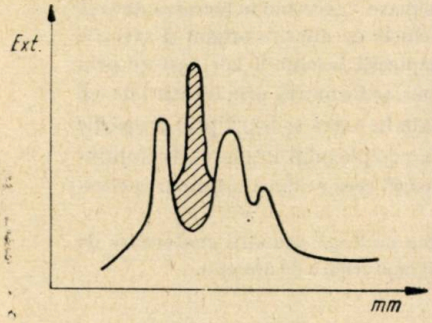


Fig. 2. — Electroforegrama extractului proteic din muşchiul gastrocnemian de broască.

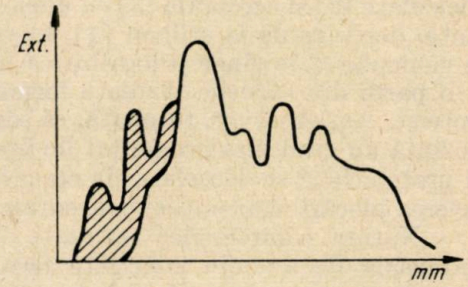


Fig. 3. — Electroforegrama extractului proteic din creierul de broască. Porţiunile haşurate corespund la fracţiunile proteice care reacţionează cu sarea cuaternară de amoniu cu formare de complecşi insolubili.

că sarea cuaternară de amoniu s-a legat de proteină fără să-şi piardă fluorescenţa, formînd un complex : proteină—sare cuaternară de amoniu. Analiza electroforetică confirmă aceste date, arătînd lipsa anumitor fracţiuni proteice din supernatantul obţinut după separarea complexului prin centrifugare.

Datele experimentale obţinute pledează pentru existenţa unor legături de tip salin între sarea cuaternară şi proteină, care rezultă prin fixarea grupării polare a sării cuaternare de amoniu de gruparea acidă a proteinei, ca şi în cazul unor săpunuri cationice, în aşa fel încît partea

hidrofobă din molecula sării cuaternare să fie îndreptată spre faza apoasă. Scăderea considerabilă a solubilităţii, care se produce în felul acesta, duce la precipitarea complexului.

Acest fapt a putut fi confirmat prin cercetarea influenţei pH-ului asupra formării complexului. Tratînd, de pildă, serul sanguin cu sarea cuaternară de amoniu la diferite valori ale pH-ului, s-a constatat că, oricare ar fi cantitatea de sare cuaternară adăugată, la un pH situat sub punctul izoelectric al fracţiunii α_1-globulinice (fracţiunea proteică care formează complexul) nu se mai formează complexul. Într-adevăr, este bine cunoscut că la un pH sub punctul izoelectric sarcina proteinelor este pozitivă. Din această cauză, ele nu pot reacţiona cu sărurile cuaternare de amoniu, care şi ele au o sarcină pozitivă. La un pH situat însă deasupra punctului izoelectric, proteinele, posedînd sarcini negative, vor putea reacţiona cu sărurile cuaternare de amoniu, prin formare de legături de tip salin.

Pe măsură ce concentraţia sării cuaternare de amoniu adăugate se măreşte la 3, 5 sau chiar 8%, precipitatul format la început începe să se redizolve, dispărînd în cele din urmă cu formarea concomitentă de cantităţi din ce în ce mai mari de complecşi solubili.

Un fenomen asemănător s-a observat şi în cazul unor complecşi între proteine şi unele săpunuri anionice [6], [7] şi cationice [8]. Solubilizarea complexului s-ar produce — după autorii respectivi — fie printr-o deformare a moleculei proteice, în sensul unei desfăşurări cu eliberare de noi grupări hidrofile, sub acţiunea concentraţiei ridicate a sării cuaternare de amoniu, fie printr-o orientare a sării cuaternare de amoniu adăugate în exces : grupările sale apolare, hipofile, s-ar îndrepta — datorită forţelor Van der Waals — spre părţile hidrofobe ale complexului, în timp ce grupările sale polare, hidrofile, sînt îndreptate spre faza apoasă, ceea ce ar duce la solubilizarea complexului. Constatările făcute cu ocazia studierii electroforegramelor în lumina ultravioletă, dar mai ales rezultatele obţinute de noi la electroforeza în coloană de lichid, vin în sprijinul ultimei ipoteze.

Complecşii solubili fiind încărcaţi pozitiv, ar trebui să se deplaseze în cursul electroforezei pe hîrtie spre catod. Faptul că pe linia de start rămîne totuşi un spot proteic fluorescent denotă o desfacere a complexului solubil sub acţiunea curentului electric, prin plecarea moleculelor de sare cuaternară de amoniu mai labil legate (legăturile Van der Waals — fiind după cum se ştie — legături relativ slabe) ; rămîn fixate doar acele molecule de sare cuaternară care sînt legate mai puternic de proteine, prin forţe electrostatice, şi care, neutralizînd cu sarcinile lor pozitive pe cele negative ale moleculei proteice fac ca aceasta să nu mai migreze în cîmpul electric.

Pentru a verifica dacă explicaţia noastră este într-adevăr justă, am supus soluţia ce conţine complecşii solubili acţiunii unui cîmp electric. În acest scop am folosit aparatul de microelectroforeză în coloană de lichid Kern LK 30. Introducînd în ramura descendentă extractul proteic tratat cu excesul de sare cuaternară de amoniu şi care aşadar conţine complecşii solubili, se constată într-adevăr, după scurt timp, separarea complexului insolubil, sub forma cunoscută de flocoane fine caracteristice. Înseamnă că complexul solubil a luat naştere într-adevăr prin înconjurarea com-

plexului insolubil cu un strat de molecule de sare cuaternară de amoniu îndreptate cu partea lor acvofilă spre faza apoasă, şi care într-un cîmp electric sau printr-o dializă scurtă faţă de apă distilată se desprind relativ uşor, cu eliberarea complexului insolubil.

CONCLUZII

1. Complecşii insolubili care se formează între sărurile cuaternare de amoniu şi anumite fracţiuni ale proteinelor serice, musculare şi cerebrale iau naştere prin legături saline: sarea cuaternară se fixează cu partea ei polară de grupările acide ale proteinei, orientîndu-şi partea ei apolară, acvofobă, spre exterior, ceea ce scade solubilitatea şi duce la precipitarea complexului.

2. Complecşii solubili care iau naştere în prezenţa unui exces de sare cuaternară de amoniu se formează prin faptul că moleculele sării cuaternare aflate în exces, fiind atrase prin forţe Van der Waals de grupările apolare ale complexului insolubil, se orientează de data aceasta invers, îndreptîndu-şi grupările lor polare, acvofile, în afară, ceea ce duce la complecşi solubili.

3. La formarea complecşilor proteină-sare cuaternară de amoniu, un rol hotărîtor revine, pe lîngă gruparea cuaternară, polară, mai ales părţii apolare, lipofile din molecula sării cuaternare de amoniu.

4. Formarea aceasta de complecşi este un fenomen interesant atît din punct de vedere practic, cît şi teoretic. El ar putea prezenta, între altele, interes pentru separarea unor anumite fracţiuni proteice dintr-un amestec de proteine şi ar putea explica acţiunea bacteriostatică şi fungicidă observată la o serie de săruri cuaternare de amoniu, tocmai prin formare de complecşi în urma interacţiunii acestor săruri cu anumite fracţiuni proteice ale celulelor vii.

Prezentată la redacţie la 29 mai 1967

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. Schell, St. cerc. biochim., **4**, 505–515, 1961.
2. H. D. Schell, St. cerc. biochim., **6**, 545–557, 1963.
3. H. D. Schell, lucrare sub tipar.
4. H. D. Schell, St. cerc. chimie, **4**, 681–692, 1961.
5. H. D. Schell, St. cerc. biochim., **6**, 61–70, 1963.
6. K. G. A. Pankhurst, R. C. Smith, Trans. Faraday Soc., **40**, 565–571, 1944.
7. F. W. Putnam, *Advances in protein chemistry*, vol. 4, p. 80–122, Academic Press Inc., New York, 1948.
8. J. Polonowski, Ann. Chim., 671–767, 1950.

ST. CERC. BIOCHIM., **10**, 4, 341–349 (1967)

PREZENŢA TRANSAMINAZEI ASPARTICE CITOPLASMATICE ÎN PREPARATELE MITOCONDRIALE ALE CREIERULUI DE ŞOBOLAN

CECILIA ŞELARIU

Rezumat.-S-au preparat mitocondriile şi citoplasma solubilă (supernatantul de la 105 000 *g*) din creierul de şobolan, pe care s-a determinat activitatea transaminazelor aspartice (L-aspartat : 2-oxoglutarat aminotransferaza EC 2.6.1.1). S-a constatat că din preparatul mitocondrial de creier se solubilizează, prin îngheţare-dezgheţare în mediu hipotonic, o cantitate redusă de transaminază aspartică. Această enzimă, determinată la două pH-uri şi în prezenţa serurilor omolog şi eterolog anti-transaminază citoplasmatică, s-a comportat ca transaminaza citoplasmatică. S-a dovedit că transaminaza din preparatul acvosolubil mitocondrial, localizată pe fracţiunea cea mai catodică, este de tip mitocondrial. Prin electroforeza în agar, s-a demonstrat existenţa formelor multiple ale transaminazei citoplasmatice. Se discută rezultatele comparativ cu datele din literatură referitoare la transaminazele intracelulare din alte organe şi în funcţie de eterogenitatea preparatului mitocondrial de creier.

Prin întrebuinţarea apei ca mediu hipotonic la îngheţarea-dezgheţa, rea mitocondriilor de creier nu se obţin antigene specifice mitocondriale-ci antigene identice cu cele din citoplasma solubilă (supernatantul de la 105 000 *g*) [1]. Pe de altă parte, există o serie de enzime similare funcţional, localizate în celulă atît în mitocondrii cît şi în citoplasmă [2]. Aceste enzime sînt specifice de formaţiune, comportarea lor cinetică şi imunochimică fiind net deosebită. Dintre ele fac parte şi transaminazele aspartice (L-aspartat : 2-oxoglutarat aminotransferaza EC 2.6.1.1). Denumite iniţial izoenzimele I şi II [3], s-a arătat apoi că izoenzima I este localizată în citoplasmă şi migrează electroforetic spre anod, pe cînd izoenzima II este legată de mitocondrii şi are o direcţie de migrare catodică [4], [5].

Prezenţa unei enzime în două formaţiuni intracelulare poate servi ca indice biochimic pentru verificarea identităţii antigenice a proteinelor acvosolubile mitocondriale cu cele din citoplasmă, constatată de noi într-o lucrare anterioară [1]. De aceea, ne-am propus luarea în studiu a unor parametri prin care transaminazele aspartice mitocondriale se deosebesc de cele citoplasmatice.

MATERIALE ŞI METODE

1. **Separarea formaţiunilor intracelulare.** S-a lucrat pe şobolani albi, sacrificaţi prin decapitare. Creierii au fost scoşi imediat, cîntăriţi, spălaţi de sînge cu zaharoză 0,25 M şi omogenizaţi cu 1000 r.p.m., tot în zaharoză 0,25 M, la 2°. Raportul a fost de 9 părţi zaharoză la 1 parte creier.

Proteinele solubile din mitocondrii. Metoda de separare a formaţiunilor intracelulare a fost o combinaţie între metodele Brody şi Bain — procedeul II [6] şi Loevtrup şi Zelander [7]. Omogenatul s-a centrifugat 10 min la 800 *g*, apoi s-a decantat. Supernatantul s-a centrifugat 10 min la 2000 *g*, iar depozitul s-a îndepărtat. Supernatantul s-a centrifugat 10 min la 14 000 *g*. Mitocondriile depuse s-au spălat de 3 ori, prin reomogenizare, cu cîte 10—15 ml zaharoză şi s-au centrifugat 15 min la 10 000 *g*. Mitocondriile rămase de la ultima spălare s-au omogenizat cu 8—10 ml apă distilată şi s-au îngheţat, pînă a doua zi, la —15°. S-au dezgheţat şi reîngheţat de 3—4 ori în cursul zilei următoare, apoi s-au centrifugat 30 min la 14 000 *g*. Supernatantul foarte limpede s-a decantat şi s-a liofilizat.

Citoplasma solubilă. Supernatantul rămas de la depunerea mitocondriilor s-a centrifugat 50 min la 105 000 *g* (centrifuga VAC—40, H. Janetzky) pentru îndepărtarea microzomilor. Supernatantul limpede (jumătatea superioară) s-a concentrat prin ultrafiltrare la aproximativ o treime, apoi s-a dializat 48 de ore contra apei distilate şi s-a liofilizat. Acest preparat, cît şi proteinele solubile din mitocondrii, s-au întrebuinţat ca enzime citoplasmatice, respectiv mitocondriale. S-au întrebuinţat probe liofilizate, deoarece s-a constatat că transaminazele îşi păstrează activitatea intactă şi după liofilizare.

2. **Prepararea antiserurilor.** Antigenele liofilizate, reluate în sol. fiziologică, s-au amestecat în părţi egale cu gel de hidroxid de aluminiu şi s-au injectat subcutanat la iepuri. Imunizarea s-a făcut cu 120 mg proteină per animal, fracţionată în 7—8 doze crescînde (3, 3, 12, 16, 24, 30 şi 32 mg) la 4—5 zile interval. Iepurii au fost sîngeraţi la 7—10 zile de la ultima injecţie. Titrarea antiserului s-a făcut cu preparatele enzimatice de mai sus.

3. **Preparatele enzimatice.** Pentru o parte din determinări s-au întrebuinţat ca enzime probele liofilizate, reluate în sol. fiziologică sau în soluţie tampon veronal, de pH 8,6. Concentraţia proteică a preparatelor liofilizate a variat între 15—30% pentru preparatele solubile mitocondriale şi 30—60% pentru preparatele citoplasmatice. S-a practicat electroforeza în gel de agar a ambelor preparate, după micrometoda Scheidegger [8], în tampon veronal/veronal sodic de pH 8,6, puterea ionică a tamponului fiind 0,05 în cuvă şi 0,017 în plăci. Potenţialul a fost de 22,5 V/cm şi intensitatea 1 mA/cm; durata migrării 2,5 ore, la temperatura camerei. În şanţ s-au introdus cîte 2 000 μg proteină. S-a tăiat în lungime o treime din gelul de agar, care s-a colorat cu amidoschwarz, cealaltă parte s-a tăiat în opt fracţiuni, de 7 mm grosime, numerotate 1—8 de la anod spre catod. Fiecare fracţiune s-a mărunţit şi s-a eluat în sol. fiziologică sau tampon veronal. Aceste eluate erau întrebuinţate şi ele ca preparate enzimatice pentru determinări. Cantitatea de eluant a variat la fiecare fracţiune, cu activitatea enzimei, stabilită prin determinări prealabile. Probele s-au ţinut la frigider 24 de ore şi înainte de întrebuinţare s-au adus la 25°.

4. **Metoda de determinare a enzimei.** S-a întrebuinţat metoda Tonhazi [9] şi rezultatele s-au exprimat în μg de piruvat. Curba etalon s-a stabilit cu piruvat de sodiu. În probele cu ser antienzimatic s-au întrebuinţat 0,5 ml soluţie de enzimă de concentraţii variabile şi 0,5 ml antiser. Probele de control conţineau 0,5 ml ser normal de iepure. S-a constatat că serul normal nu inhibă activitatea enzimatică.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

S-a determinat concentraţia optimă a substratelor, preparînd substratele pentru determinările de transaminaze cu concentraţii variate de acid DL-aspartic şi acid α-cetoglutaric, de la 0,1 M la 0,3 M. Din figura 1 reiese că ambele enzime se comportă similar. Am repetat determinările cu un preparat enzimatic din extractul apos de mitocondrii de ficat, obţinut în aceleaşi condiţii ca cel din creier. Din figura 1 rezultă că acest preparat

mitocondrial are un alt optim al concentrației substratului decît cel de creier. Nu am determinat valorile Km, deoarece preparatele noastre nu erau enzime pure, cunoscut fiind că valoarea variază cu puritatea preparatului.

Latența și solubilizarea enzimei. S-a determinat activitatea transaminazelor, atît pe extractul apos de mitocondrii de creier cît și pe mitocondriile trecute în suspensie. S-a constatat că în extractul apos trece doar a 4-a — a 5-a parte din activitatea prezentată de suspensiile de mitocondrii rămase după îndepărtarea supernatantului apos (tabela 1).

Dependența reacțiilor enzimatice de pH. Ambele izoenzime se pot caracteriza după comportarea lor la două pH-uri deosebite — 6,0 și 7,6 [3], [4]. Enzima mitocondrială nu este afectată de modificarea pH-ului optim 7,5, pe cînd enzima citoplasmatică are o activitate mult mai mică la pH 6,0 decît la pH 7,5. Determinările s-au făcut pe preparate enzimatice luate în cinci concentrații diferite. Din figura 2 reiese că ambele enzime au aceeași comportare, de tipul enzimei citoplasmatice din ficat, mușchi, inimă etc.

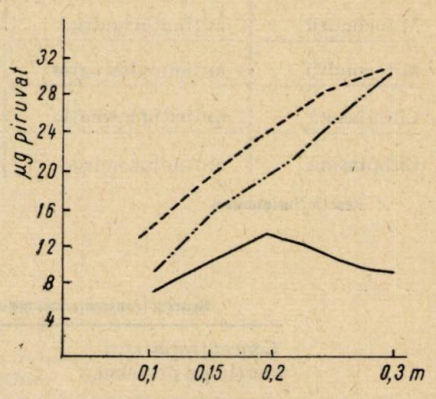


Fig. 1. — *Concentrația optimă a substratelor.*
– – – – activitatea transaminazei din preparatul citoplasmatic.
– ·· – ·· activitatea transaminazei din preparatul acvosolubil mitocondrial din creier.
——— activitatea transaminazei din preparatul acvosolubil mitocondrial din ficat.
m = molaritatea acidului DL-aspartic și a acidului α-cetoglutaric.

Dependența de timp a reacției enzimă-antienzimă. Deoarece timpul de contact între enzimă și antiser variază de la 2 ore la 37° și 66 de ore la 4° (10) pînă la reacție instantanee [11], am făcut determinări după perioade variate de contact. Din tabela 2 reiese că reacția este maximă începînd de la 10 min.

Titrarea transaminazei mitocondriale cu antiserurile omolog și eterolog. La concentrații mici ale enzimei, în prezența antiserului omolog, rămîne doar 40% din activitate. O dată cu creșterea concentrației enzimei, activitatea rămasă crește și ea, ajungînd, de la 300 μg în sus, la 75%. În prezența serului eterolog rămîne 75% activitate enzimatică, la toate concentrațiile enzimei luate în studiu (tabela 3).

Tabela 1

Activitatea transaminazică din proteinele acvosolubile și mitocondriile în suspensie (μg ac. piruvic/g țesut proaspăt)

Proteine solubile mitocondriale	685
Mitocondrii rămase (trecute în suspensie)	2 386

Titrarea transaminazei citoplasmatice cu antiserurile omolog și eterolog. Pentru toate concentrațiile enzimei, în prezența antiserurilor atît omolog cît și eterolog rămîne 70% activitate (tabela 4). În condiții de lucru foarte asemănătoare cu ale noastre, Lowenstein și colab. [12] nu au obținut pentru izocitratdehidrogenaza din citoplasmă decît o inhibiție de 20% cu antiserul omolog.

Tabela 2

Dependența de timp a interacțiunii enzimă-antiser la 25° și la pH 7,5

Enzima	Antiser	% activitate rămasă					
		0* min	10 min	1 oră	4 ore	24 ore	96 ore
Mitocondrii	antimitocondrial	50	40	43	42	40	43
Mitocondrii	anticitoplasmatic	80	75	75	77	80	80
Citoplasmă	anticitoplasmatic	75	70	70	72	75	70
Citoplasmă	antimitocondrial	77	70	75	75	80	—

* Reacție instantanee.

Tabela 3

Reacția transaminazei mitocondriale cu antiserurile omolog și eterolog

Concentrația enzimei (în μg proteină)	% activitate rămasă	
	Antiserul omolog	Antiserul eterolog
10	42	75
50	40	75
100	40	77
200	60	75
300	75	80
800	75	—
2 000	75	—

Tabela 4

Reacția transaminazei citoplasmatice cu antiserurile omolog și eterolog

Concentrația enzimei (μg proteină)	% activitate rămasă	
	Antiserul omolog	Antiserul eterolog
10	70	70
50	72	75
100	70	70
200	75	75
300	75	75
800	70	70
2 000	—	—

Enzimele eluate din gelul de agar. Deoarece în prezența serului anti-citoplasmatic în preparatul mitocondrial rămîne 75% din activitatea transaminazică, am efectuat electroforeza în agar a preparatelor pentru a realiza o separare mai bună a enzimelor. Rezultatele (fig. 3) indică un

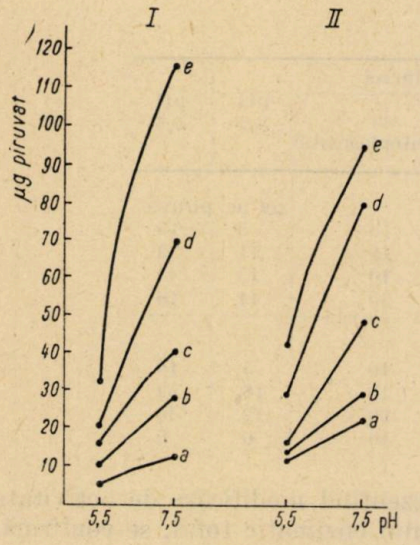


Fig. 2. — *Dependența reacțiilor enzimatice de pH.*

I = Izoenzima din preparatul citoplasmatic.
II = Izoenzima din preparatul acvosolubil mitocondrial.
Concentrațiile preparatelor enzimatice exprimate în µg sînt: $a = 51$, $b = 128$, $c = 320$, $d = 800$, $e = 2000$.

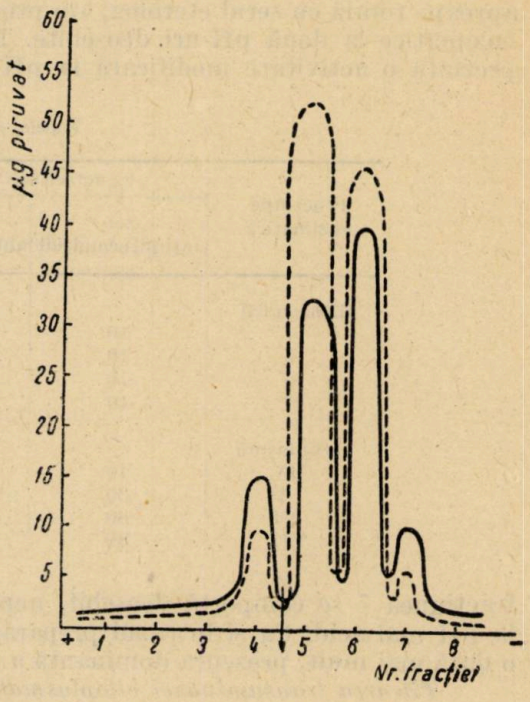


Fig. 3. — *Transaminazele eluate din gelul de agar.*
——— activitatea transaminazei din preparatul acvosolubil mitocondrial.
— — — activitatea transaminazei din preparatul citoplasmatic.
Numerotarea fracțiilor de la anod spre catod 1—8.
Startul însemnat cu săgeată.

număr de patru fracțiuni cu activitate transaminazică pentru fiecare preparat. Aceste date sînt în acord cu literatura. Astfel, din omogenatul total de ficat s-au obținut pe coloană de DEAE-celuloză trei fracțiuni cu activitate enzimatică, din care două cu activitate de tip citoplasmatic [5], [10], [13]. Prin electroforeză în amidon s-a constatat că enzima citoplasmatică conține trei componente separabile pe coloană de CM-Sephadex, ceea ce dovedește că există forme multiple ale enzimei citoplasmatice [14]. Separarea noastră pe agar demonstrează și ea prezența de forme multiple ale enzimei citoplasmatice.

Titrarea transaminazei mitocondriale eluate din gel cu antiserurile omolog și eterolog. Din tabela 5 reiese că în prezența serului omolog rămîne doar 10% activitate la toate cele patru fracțiuni. La reacția eteroloagă se constată aceeași inhibiție, aproape totală, la trei fracțiuni. Numai la fracțiunea 7 se obține o inhibiție de 50% a activității enzimatice. Deci,

separarea electroforetică în mai multe fracțiuni face posibilă o inhibiție mult mai mare a activității pentru fiecare fracțiune în parte.

Dependența de pH a activității transaminazei mitocondriale. Cercetările realizate cu seruri antitransaminazice au demonstrat specificitatea de formațiune a fiecărei enzime [10], [15]. Deoarece am obținut o inhibiție aproape totală cu serul eterolog, am procedat și în acest caz la determinări enzimatice la două pH-uri deosebite. Enzimele de pe fracțiunile 1, 5, 6 prezintă o activitate modificată la pH 5,5 (tabela 5). Doar enzima din

Tabela 5

Fracțiune enzimatică	% activitate rămasă		pH 5,5	pH 7,5
	ser antimitocondrial	ser anticitoplasmatic		
Mitocondrii			μg ac. piruvic	
4	10	10	5	15
5	10	10	11	33
6	10	10	13	40
7	10	50	11	10
Citoplasmă				
IV	10	10	5	10
V	30	10	18	52
VI	60	20	12	46
VII	80	10	0	6

fracțiunea 7 se comportă deosebit, neprezentînd modificări de activitate la pH mai acid. Ca și în cazul preparatului enzimatic total, se confirmă, o dată mai mult, prezența dominantă a enzimei citoplasmatice.

Titrarea transaminazei citoplasmatice eluate cu antiserurile omolog și eterolog. În prezența serului omolog rămîne numai 10% din activitate la toate cele patru fracțiuni. În prezența serului eterolog rămîn activități mai mari la fracțiunile VI și VII (tabela 5).

Dependența de pH a activității transaminazei citoplasmatice. Și activitatea enzimei citoplasmatice s-a determinat la două pH-uri deosebite. La toate fracțiunile activitatea era mult mai scăzută la pH acid (tabela 5).

Rezultatele obținute demonstrează că din preparatele mitocondriale de creier de șobolan, prin înghețare în mediu apos, se extrage doar transaminaza de tipul citoplasmatic, repartizată pe trei fracțiuni. Se știe că din majoritatea țesuturilor nu se extrage în mediu apos decît puțină transaminază localizată în mitocondrii [4], [13], [16]. Mai mult, s-a demonstrat prezența ambelor transaminaze pe extractele apoase de ficat, inimă și rinichi; numai în extractul de creier nu se obține enzima mitocondrială [17], enzimă care se solubilizează doar în prezența digitoninei [18]. Se demonstrează încă o dată comportarea deosebită a enzimei mitocondriale din creier, care trece și mai greu în soluție decît enzimele din alte organe. În aceste condiții, solubilizarea efectuată de noi doar cu mediu hipotonic și înghețare-dezghețare nu a reușit să extragă enzima mitocondrială ci, după Borst [5], doar acea parte a ei care este ușor solubilă. Am constatat că această parte se comportă ca enzimă citoplasmatică și nu este de tip mitocondrial. Fracțiunea 7 are însă o comportare asemănătoare aceleia a

enzimei mitocondriale. Reiese că se extrage şi o foarte mică cantitate de enzimă mitocondrială, care în experienţele cu preparatul total nu este sesizabilă. Ea este catodică şi nu îşi modifică activitatea la pH acid.

Pe de altă parte, se ştie că mitocondriile cerebrale au cu totul alte proprietăţi decît cele de ficat, rinichi şi inimă [19]. Astfel şi comportarea malatdehidrogenazei, altă enzimă care are aceeaşi repartiţie intracelulară ca transaminazele, este deosebită la creier, prin faptul că în mediu apos se solubilizează o parte din enzima mitocondrială cu caracteristicile enzimei de tip citoplasmatic [20]. Se presupune prezenţa în preparatul mitocondrial a citoplasmei, prinsă în resturile de axon incomplet sfărîmate în timpul omogenizării, prezenţă care ar explica deosebirea mitocondriilor cerebrale de mitocondriile din celelalte organe [21]. În sprijinul acestei presupuneri vine şi lucrarea lui Tanaka şi colab. [22] care, făcînd o subfracţionare a preparatului mitocondrial, obţin 4 fracţiuni, din care două straturi conţin în majoritate numai mitocondrii, iar celelalte două conţin fragmente de axoni, mielină, membrane, unele particule veziculare, precum şi terminaţii nervoase. Eterogenitatea preparatului mitocondrial ar putea explica şi inhibiţiile mai mici ale activităţii ambelor transaminaze din creier, obţinute de Morino şi colab. [15] cu antiseruri specifice omoloage de ficat, faţă de inhibiţiile aproape totale ale activităţii cu acelaşi ser la alte organe de aceeaşi specie sau de specii deosebite, precum şi rezultatele noastre la fracţiunile VI şi VII ale enzimei citoplasmatice în prezenţa antiserului eterolog. De asemenea, antigenele specifice mitocondriale ar putea fi „mascate" total de către citoplasma prezentă în preparatele întrebuinţate.

Cu toată această eterogenitate a mitocondriilor de creier, nu trebuie exclusă totuşi nici posibilitatea originii mitocondriale a transaminazei de tip citoplasmatic, prezentă în preparatul mitocondrial. Această posibilitate este susţinută de constatarea că la nivelul sistemului nervos central există o asemănare între membrana externă a mitocondriei şi reticulul endoplasmatic [23]. Se ştie însă că transaminaza mitocondrială este localizată în fracţiunea solubilă S a membranei externe mitocondriale [24], [25], [26]. Luînd în considerare eterogenitatea preparatului mitocondrial de creier, prezenţa aceleiaşi enzime în două formaţiuni nu poate servi ca indice biochimic pentru verificarea identităţii antigenice a proteinelor solubile în interiorul celulei. Originea citoplasmatică a fracţiunii S, care conţine transaminaza mitocondrială, ar putea determina prezenţa unei părţi de transaminază citoplasmatică în mitocondrii.

CONCLUZII

1. Obţinîndu-se preparatele acvosolubile mitocondriale şi citoplasmatice (supernatant de la 105 000 *g*) din creierul de şobolan, cît şi eluatele din gelul de agar ale acestor preparate, care s-au întrebuinţat pentru determinarea activităţii transaminazelor aspartice, s-a constatat solubilizarea redusă a transaminazei din mitocondrii.

2. Prin comportarea la două pH-uri deosebite şi reacţia cu serurile omoloage şi eteroloage, s-a constatat că transaminaza solubilizată din mitocondrii este de tip citoplasmatic.

3. Prin electroforeza în agar a preparatelor citoplasmatice şi mitocondriale s-au obţinut patru fracţiuni cu activitate transaminazică. Aceasta demonstrează existenţa formelor multiple ale enzimei citoplasmatice.

4. În preparatul acvosolubil mitocondrial s-a demonstrat că activitatea transaminazei localizate pe fracţiunea cea mai catodică este de tip mitocondrial.

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, Bucureşti

Prezentată la redacţie la 1 iulie 1967

BIBLIOGRAFIE

1. C. Şelariu, *The comparative study of soluble antigens in mitochondria and cell-sap of rat brain*, Rev. roum. biochimie, **2**, 79 (1965).
2. A. L. Lehninger, *The mitocondrion: Molecular basis of structure and function*, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1964.
3. G. A. Fleisher, C. S. Potter, K. G. Wakin, M. Pankov, D. Osborne, *Separation of two glutamic-oxal-acetic transaminases by paper electrophoresis*, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y., **103**, 229 (1960).
4. J. W. Boyd, *The intracellular distribution, latency and electrophoretic mobility of L-glutamate-oxalacetate transaminase from rat liver*, Biochem. J., **81** 434 (1961).
5. P. Borst, E. M. Peeters, *The intracellular localization of glutamate-oxaloacetate transaminases in heart*, Biochim. biophys. Acta, **54**, 188 (1961).
6. T. M. Brody, J. A. Bain, *A mitochondrial preparation from mammalian brain*, J. biol. Chem., **195**, 685 (1952).
7. S. Loevtrup, T. Zelander, *Isolation of brain mitochondria*, Exp. Cell Res., **27**, 468 (1962).
8. J. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
9. N. E. Tonhazi, N. C. White, W. W. Umbreit, *A rapid method for the estimation of the glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation sichness*, Arch. Biochem., **28**, 36 (1950).
10. J. S. Nisselbaum, O. Bodansky, *Immunochemical and kinetic properties of anionic and cationic glutamic-oxaloacetic transaminases separated from human heart and human liver*, J. biol. Chem., **239**, 4232 (1964).
11. I. Broder, P. A. Srere, *Immunochemical studies with citrate condensing enzyme*, Biochim. biophys. Acta, **67**, 617 (1963).
12. J. M. Lowenstein, S. R. Smith, *Intra- and extramitochondrial isocitrate dehydrogenases*, Biochim. biophys. Acta, **56**, 385 (1962).
13. J. W. Boyd, *The extraction and purification of two isoenzymes of L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase*, Biochim. biophys. Acta, **113**, 302 (1966).
14. M. Martinez-Carrion, F. Riva, C. Turano, P. Fasella, *Multiple forms of supernatant glutamate-aspartate transaminase from pig heart*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **20**, 206 (1965).
15. Y. Morino, H. Kagamiyama, H. Wada, *Immunochemical distinction between glutamic-oxaloacetic transaminases from the soluble and mitochondrial fractions of mammalian tissues*, J. biol. Chem., **239**, PC 943 (1964).
16. J. W. Boyd, *The extraction and separation of isoenzymes of aspartate transaminase*, Biochem. J., **84**, 14 P (1962).
17. T. R. C. Boyde, A. L. Latner, *Starch-gel electrophoresis of transaminases in human-tissue extracts and sera*, Biochem. J., **82**, 51 P (1962).
18. O. Z. Sellinger, D. L. Rucker, *Latency and solubilization of the mitochondrial aspartate transaminase of rat cerebral cortex*, Biochim. biophys. Acta, **67**, 504 (1963).
19. C. H. Gallagher, J. D. Judah, K. R. Rees, *Glucose oxidation by brain mitochondria*, Biochem. J., **62**, 436 (1956).
20. M. K. Johnson, *How many malate dehydrogenases in rat brain homogenate?*, Biochem. J., **84**, 25 P (1962).

21. M. K. Johnson, V. P. Whittaker, *Lactate dehydrogenase as a cytoplasmic marker in brain*, Biochem. J., **88**, 404 (1963).
22. R. Tanaka, L. G. Abood, *Studies on ATP-ase of relatively pure mitochondria, and other cytoplasmic constituents of rat brain*, Arch. Biochem. Biophys., **105**, 554 (1964).
23. D. F. Parsons, *Ultrastructural and molecular aspects of cell membranes*, Proc. VII-th Canad. Cancer Res. Conf., 1966.
24. E. Bachmann, D. W. Allmann, D. E. Green, *On the membrane system of the mitochondrion. I. S-fraction of the outer membrane of beaf heart mitochondria*, Arch. Biochem. Biophys., **115**, 153 (1966).
25. D. W. Allmann, E. Bachmann, D. E. Green, *On the membrane system of the mitochondrion. II. K-fraction of the outer membrane of beef heart mitochondria*, Arch. Biochem. Biophys., **115**, 165 (1966).
26. D. Green, E. Bachmann, D. Allmann, J. Perdue, *On the membrane system of the mitochondrion. III. The isolation and properties of the outer membrane of beef heart mitochondria*, Arch. Biochem. Biophys., **115**, 172 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 4, 351–355 (1967)

CONSIDERAŢII PRIVIND INCIDENŢA FRACŢIUNILOR EUGLOBULINICE ÎN POZITIVAREA TESTELOR DE DISPROTEINEMIE (R.TIMOL ŞI R.JAYLE-BADIN)

FLORICA TOCILESCU şi OLIMPIA MAMULEA

Rezumat. — Crearea forţei ionice scăzute a mediului de reacţie în testul timol şi în testul Jayle-Badin a permis determinarea densităţii optice la aceeaşi lungime de undă la care se determină şi fracţiunile euglobulinice, redate prin fişa reticuloendotelială a lui Sandor şi Vargues.

Rezultatele obţinute pe 300 de cazuri relevă incidenţa fracţiunii *beta*-euglobulinice în pozitivarea testului Jayle-Badin, respectiv a fracţiunii I_1 — *beta*-euglobulinice în pozitivarea testului timol.

Eterogenitatea proteinelor plasmatice, exprimată printr-o scară largă de variaţie a caracteristicilor lor fizico-chimice, este expresia unor deosebiri din punctul de vedere al originii şi al funcţiilor biologice proprii fracţiunilor proteice.

Echilibrul normal al proteinelor sanguine depinde de activitatea de sinteză şi degradare, determinată genetic, ca şi de răspunsul reacţional la incitaţiile exogene. Dereglarea acestui echilibru determină perturbări cantitative sau calitative ce afectează spectrul protidic al plasmei, cu instalarea unei stări de disproteinemie, respectiv paraproteinemie. Evidenţierea acestei stări se realizează în laboratorul clinic prin testele de disproteinemie şi prin electroproteinogramă. Dacă prin proteinogramă sînt redate raporturile procentuale ale fracţiunilor proteice, testele de disproteinemie relevă perturbarea raporturilor cantitative sau calitative ale fracţiunilor proteice specifice testului respectiv.

Dintre posibilităţile de evidenţiere a labilităţii coloidale a serului, fişa reticuloendotelială (F. R. E.) a lui Sandor şi Vargues relevă aspecte ale echilibrului cantitativ şi calitativ al sistemului euglobulinic [10], [11], [12], [14], [18], [19].

Atît F. R. E. cît şi proteinograma reprezintă separări de compuşi protidici după punctul lor izoelectric, respectiv după sarcina electrică a moleculei. Unitatea factorului de separare care stă la baza celor două metode de analiză nu reduce însă importanţa determinării F. R. E. paralel cu proteinograma, din următoarele considerente [2], [3], [9]:

— pentru studiul modificărilor cantitative şi calitative ale proteinelor plasmatice este necesară utilizarea simultană a tehnicilor fizice şi chimice;

— dacă prin proteinogramă se pun în evidenţă perturbări ale globulinelor, F. R. E completează acest aspect prin analiza cantitativă şi calitativă a euglobulinelor [8], [4].

Datorită rolului generator al globulinelor serice, deci şi al euglobulinelor serice, sistemul reticuloendotelial (S. R. E) îşi exprimă modificările sale fiziopatologice în variaţiile F. R. E.

Faptele experimentale arată constanţa din punct de vedere cantitativ şi calitativ a euglobulinelor serice la subiectul normal şi variaţia lor în diferitele stări patologice legate de modificări ale S. R. E. ; aceste considerente justifică denumirea de F. R. E. a testului euglobulinelor serice.

Edsal defineşte euglobulinele ca proteide insolubile la punctul lor izoelectric, la forţă ionică redusă. Separarea lor din ser este obţinută prin precipitarea globulinelor cu $(NH_4)_2SO_4$ semisaturat şi dializarea lor faţă de o soluţie de Na_2SO_4 5‰ pentru îndepărtarea NH_4^+) şi apoi faţă de H_2O distilată, condiţii în care euglobulinele precipită, pseudoglobulinele rămînînd în soluţie [9]. Euglobulinele aparţin deci, în mare majoritate, grupului de *gamma*-globuline. Variaţiile cantitative sînt de 7—9 g la ‰ [5], [7], [12].

În lumina acestor date privitoare la biochimia sistemului euglobulinic, am urmărit incidenţa acestor fracţiuni în pozitivarea testelor de disproteinemie. Astfel, obţinerea precipitării în condiţii de forţă ionică scăzută şi pH diferit atît a fracţiunilor euglobulinice, în cadrul F. R. E., cît şi a testelor de disproteinemie, pare să arate că în biochimismul lor există un factor comun.

MATERIAL ŞI METODE

Pe un număr de 300 de seruri s-au efectuat testele timol şi Jayle-Badin, paralel cu F.R.E. a lui Sandor şi Vargues. Testul timol s-a lucrat după metoda adaptată fotometric [1].

Mod de lucru : se adaugă 0,1 ml ser la 6 ml reactiv timol pH = 7,8. Se agită, iar după 30 min se măsoară densitatea optică la fotometrul Pulfrich, în cuva de 1 cm grosime de strat, cu filtrul S_{61}, lichidul de referinţă fiind H_2O. În aceste condiţii, valorile fiziologice sînt cuprinse între 0,02 — 0,10 (1).

Testul Jayle-Badin modificat [7] s-a utilizat după adaptarea fotometrică.

Mod de lucru : se amestecă 0,05 ml ser cu 5 ml reactiv Hayem, diluat în prealabil 1/100, pH-ul mediului = 6,30. Turbiditatea rezultată se determină la fotometru după 30 min, în cuva de 1 cm grosime de strat, cu filtrul S_{61}, lichidul de referinţă fiind H_2O. În aceste condiţii, valorile normale sînt cuprinse între 0,05 — 0,30.

F.R.E. s-a efectuat după tehnica Sandor, modificată de Vargues [14], [15].

Mod de lucru : din amestecul rezultat dintr-o cantitate constantă de tampon Britton-Robinson (acid fosforic 3,92 g ; acid boric 2,48 g, acid acetic 2,40 g, H_2O distilată la 1000 ml), pH = 1,8 şi o cantitate variabilă de NaOH 0,05 N, se obţin 8 eşantioane după cum urmează :

nr. flacon	1	2	3	4	5	6	7	8
tampon dil. 1/8 (ml)	40	40	40	40	40	40	40	40
NaOH 0,05N (ml)	11	10	9	8	7	6	5	4
pH rezultat	7,3	6,8	6,3	5,8	5,3	4,6	4,1	3,6

La 2 ml din amestecurile de mai sus se adaugă 0,05 ml ser şi se agită. Se lasă în repaus 30 min şi se efectuează lectura opacimetrică la fotometrul Pulfrich, în cuva de 0,5 cm grosime

de strat, cu filtrul S_{61}. Rezultatul se exprimă în modulul extincţiei (înmulţindu-se densitatea optică cu 2).

La pH 7,3 precipită doar euglobulina I_1; între pH 7,4 şi 6,5 precipită *gamma*-euglobulina între pH 6,5 şi 5,5 precipită *beta*- şi mici cantităţi de *alfa*- şi *gamma*-euglobuline, iar sub pH 5,5 precipită numai *alfa*-euglobulinele. Notînd pe un grafic pe ordonată densitatea optică şi pe abscisă pH-urile, reunirea punctelor experimentale permite construirea unor grafice cu aspect de clopot [6]. Ele reprezintă, pentru fiecare pH, cantitatea precipitată din fracţiunea euglobulinică şi indică apariţia fracţiunilor ce au suferit o creştere relativă. Deoarece în F.R.E.-ul cu aspect normal procentul cel mai mare de euglobuline revine fracţiunii *beta*, iar *gamma*- şi *alfa*-euglobulinele sînt aproape în cantitate egală, curba este simetrică faţă de axa de pH = 5,5 (fig. 1). Densitatea optică maximă în cazuri fiziologice este considerată = 0,30.

În diagramele patologice poate predomina una din fracţiuni, rezultînd astfel F.R.E. hiper- *gamma*, cu deplasare spre domeniul alcalin, respectiv hiper-*alfa* şi hiper-*beta*, cu deplasare spre domeniul acid. Devierea alcalină se consideră corespunzătoare unei hiperplazii a S.R.E., iar devierea acidă ca expresie a unui blocaj al S.R.E. [16].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Evaluarea fracţiunilor euglobulinice şi a testelor timol şi Jayle-Badin, în condiţii de forţă ionică scăzută a mediului de reacţie la un pH dat, precum şi estimarea gradului de turbiditate la aceeaşi lungime de undă a spectrului au stat la baza incidenţei fracţiunilor euglobulinice în testele respective.

Din punctul de vedere al factorului utilizat pentru evidenţierea labilităţii coloidale a serului, reacţiile de disproteinemie luate în studiu se bazează, în testul Jayle-Badin, pe turbiditatea dată de soluţia sării unui metal bivalent ($HgCl_2$), respectiv, în testul timol, de soluţia unei substanţe organice (timol) într-un mediu tamponat.

Atît în F. R. E. cît şi în testele de disproteinemie (reacţia timol şi reacţia Jayle-Badin), forţa ionică scăzută a mediului de reacţie creează situaţii analoge de coprecipitare, în condiţii de pH identice sau apropiate. Din punctul de vedere al forţei ionice şi al pH-ului, reacţia Jayle-Badin creează condiţii analoge de precipitaţii cu fracţia euglobulinică de pH = 5,8 (*beta*-euglobulina coprecipitată cu *alfa*- şi *gamma*-euglobulina). Deoarece în modificarea adusă reacţiei Jayle-Badin s-a menţinut proporţionalitatea între cantitatea de ser şi cantitatea de electrolit, flocularea obţinută se datoreşte pe de o parte euglobulinelor din fracţiunea respectivă, iar pe de altă parte precipitării fracţiunii proteice sub acţiunea Hg^{++}.

În sprijinul celor afirmate s-au observat experimental, pe aceleaşi seruri, valori normale pentru F. R. E. la pH = 5,8, paralel cu valori foarte ridicate pentru testul Jayle-Badin (exemplificarea unui caz extrem).

Fişa reticuloendotelială

pH	7,3	6,8	6,3	5,8	5,3	4,6	4,1	3,6	R. timol	R. Jayle-Badin
probe	0,04	0,08	0,10	0,12	0,12	0,16	0,16	0,10	0,03	1,30
paralele	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,14	0,08	—	1,32

Reacţia timol, la baza căreia există de asemenea o rarefacţie electrolitică la pH = 7,8, reproduce în parte condiţiile de precipitare ale euglobulinei I_1 cu punct izoelectric = 7,4. La pH = 7,8 precipită euglobulina I_1, care se combină cu timolul, astfel încît molecula propriu-zisă se află înconjurată de nuclee benzenice care atrag lipidele şi antrenează coprecipitarea complexelor lipoprotido-*beta-gamma*-globulinice (13).

Studiul statistic efectuat pe 330 de cazuri între reacţia Jayle-Badin şi fracţiunea euglobulinică la pH = 5,8 arată o strînsă corelaţie pozitivă (r = 0,830).

În acelaşi mod s-a stabilit o strînsă corelaţie pozitivă (r = 0,771) între F. R. E. la pH = 7,4 şi reacţia timol.

Dată fiind complexitatea fracţiunilor protidice şi lipidoprotidice ce intervin în pozitivarea reacţiei timol, am considerat util de a corela rezultatele reacţiei timol cu F. R. E. de pH 5,8. Astfel, pe lîngă euglobulina I_1 în pozitivarea testului timol intervin cenapse *beta*-lipoproteinice, fosfolipide, *beta*- şi *gamma*-globuline.

Faptul că euglobulinele totale constituie o fracţiune *gamma*-globulinică, în care *beta*-euglobulina, formată în general din lipoproteine, alcătuieşte 70% din componenţa totală [13], [17], [20], ar explica o incidenţă între F. R. E. pH = 5,8 şi reacţia timol.

Dacă reacţia timol reproduce prin condiţii similare de pH şi forţa ionică precipitarea euglobulinei I_1, ea realizează prin orientarea grupărilor fenolice în jurul fracţiunii lipoproteinice condiţii de coprecipitare ale *beta*-euglobulinelor şi lipoproteinelor.

În evidenţierea celor de mai sus, s-a stabilit o strînsă corelaţie pozitivă (r = 0,808) între reacţia timol pH = 7,8 şi fracţiunea euglobulinică pH = 5,8.

CONCLUZII

În reacţia Jayle-Badin, efectuată în condiţiile menţionate, alături de fracţiunile proteice afectate de Hg^{++}, precipită şi fracţiunea euglobulinică de pH 5,8 (*beta*-euglobulina).

Prin mecanismul chimic de reacţie, testul timol realizează condiţii de coprecipitare ale euglobulinei I_1 (pH = 7,4), datorită forţei ionice scăzute şi pH-ului = 7,8.

Prin orientarea lipoproteinelor în jurul grupărilor OH fenolice se realizează condiţii de coprecipitare a *beta*-euglobulinei, alături de lipoproteide şi fosfolipide.

Determinarea incidenţei fracţiunilor euglobulinice în pozitivarea testelor de disproteinemie lărgeşte orizontul de interpretare a acestora şi scoate în evidenţă un substrat biochimic nou în mecanismul de reacţie a testelor nespecifice.

Prezentată la redacţie la 28 octombrie 1966

Laboratorul de biochimie, Institutul pentru Expertiza şi recuperarea capacităţii de muncă şi Laboratorul de biochimie, Spitalul clinic Panduri, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Alteraş I., Cajal N., Cojocaru I., Comoroşan S., Dăncescu P., Ieremia P., Kondi V., Mitrică N., *Manual de laborator clinic*, Ed. medicală, Bucureşti (1962).
2. Biserte G., Havez R., Dantreveaux M., Leroy N., Valdiguié P., *Techniques chimiques d'étude des protéines sériques anormales*, Ann. Biol. clin., **20**, 855 (1962).
3. Fauvert R., *Conception d'ensemble des dysprotéinémies. Valeurs d'orientation des signes clinique et biologique usuels*, Ann. Biol. clin., **20**, 829 (1962).
4. Hirsch H. M., Catan R., Vesin, *Les euglobulines. Intérêt de leur étude en clinique*, Sem. Hôp. Paris, **37**, 2691 (1961).
5. Leroy M., Tichit L., *L'évolution de la fiche réticulo-endothéliale de Sandor, au cours de la thrombophlébite*. Ann. Biol. clin, **18**, 508 (1960).
6. Loiseleur J., *Techniques de laboratoire-chimie clinique*, Masson et Co., Paris, ed. a 2-a, II (1954).
7. Mallarmé J., Auzepy P. H., *Etude cytologique des dysprotéinémies au microscope optique*, Ann. Biol. clin., **20**, 839 (1962).
8. Polonowsky J., Douste-Blazy L., Valdiguié P., *Lipides plasmatiques dans les dysprotéinémies*, Ann. Biol. clin., **20**, 925 (1962).
9. Sandor G., Guillard Ph., Sandor M., *Une méthode d'interprétation quantitative de la fiche réticulo-endothéliale. Evaluation du domaine non interprétable du point de vue pathologique*, Ann. Biol. clin., **12**, 241 (1963).
10. Sandor G., *Un nouveau test de physio-pathologie : la fiche réticulo-endothéliale*, Algérie médicale, **36**, 93 (1952).
11. Sandor G., Lévy M., *Confrontation de l'électrophorèse sur papier et de la fiche réticulo-endothéliale au cours des myélomes*, Ann. Biol. clin., **16**, 97 (1958).
12. Sirjean Gaston, *Encyclopédie de biologie médicale*, Ed. Gaston Sirjean, Paris, nr. 34 (1958).
13. Vargues M. R., Schenebri L., *Les réactions sériques non spécifiques et la fiche réticulo-endothéliale de Sandor*, Algérie médicale, **58**, 237 (1954).
14. Vargues M. R., *La fiche réticulo-endothéliale de Sandor appliquée à la clinique. Aquisitions nouvelles résultant de l'étude de 1000 serums*, Algérie médicale, **57**, 1772 (1953).
15. Vargues M. R., *Proposition d'une technique simplifiée pour l'établissement de la fiche réticulo-endothéliale de Sandor*, Algérie médicale, **2**, 99 (1952).
16. Vargues R., Fabiani G., *La fiche réticulo-endothéliale de Sandor, technique simplifiée appliqué à l'étude de 300 serums de malades*, Algérie médicale, **56**, 705 (1952).
17. Vargues R., Aron E., *Interprétation des tests non-spécifiques utilisés dans l'instantané hépatique*, Arch. mal. App. dig., **48**, 6, 688 (1959).
18. Vargues R., Labrosse S., *Etude physique, chimique et biologique de l'euglobuline I_e de Sandor (euglobuline Gamma lente)*, Presse méd., **84**, 1740 (1954).
19. Vargues R., Massonat J., *Identité de la cryoglobuline et de l'euglobuline de Sandor à propos d'un cas de cryoglobulinémie*, Algérie médicale, **59**, 93 (1955).
20. Wuhrmann F., Wunderly Ch., *The human blood proteins*, Ed. Grune and Stratton, New York-London, ed. a 3-a (1960).

ST. CERC. BIOCHIMIE. 10, 4, 357–367 (1967)

REFERATE GENERALE

ORGANOGENEZA ŞI BIOSINTEZA PROTEINELOR SPECIFICE LA PLANTELE SUPERIOARE

VICTOR GHEŢIE

Formarea plantulei şi maturizarea ei ulterioară implică creşterea şi dezvoltarea embrionului, constituit, la unele plante, din aceleaşi organe ca şi planta dezvoltată : rădăcină, tulpină şi frunze. La nivelul acestor părţi au loc atît procese de diviziune celulară, cît şi de diferenţiere. Caracterul proteic specific al celulelor diferenţiate poate fi mascat de celulele aflate în diviziune şi care reprezintă majoritatea populaţiei celulare din părţile axului embrionar. De aceea, în primele zile ale creşterii şi dezvoltării, este greu de distins caracterul proteic specific al primordiilor viitoarelor organe.

Folosind un antiser anticoleoptil, S. Wright [1] a arătat că, la grîu, în faza meristematică de creştere, coleoptilul poartă multe antigene în comun cu radicula. Pe măsură ce plantele se dezvoltă, caracterele antigenice comune slăbesc şi apar antigenele specifice fiecărei formaţiuni. Antigenele specifice de la nivelul primordiilor pot fi mascate nu numai datorită cantităţii mici în care se găsesc la începutul diferenţierii, ci şi datorită unei localizări intracelulare care îngreunează extragerea şi studierea lor. Tot S. Wright [1] a demonstrat că există un antigen specific coleoptilului, care este asociat cu microzomii (ribozomii). Desigur că şi în gemulă şi radiculă pot exista antigene organospecifice, dar ele nu puteau fi detectate cu serul anticoleoptil folosit. Aceste experienţe sînt importante şi pentru că atrag atenţia asupra unui aspect care nu a fost luat în considerare de puţinii experimentatori care s-au consacrat acestei probleme, şi anume : stabilirea caracterului proteic specific al diferitelor părţi din plantulă, ca şi apariţia caracterelor proteice noi în procesul creşterii şi dezvoltării nu trebuie studiate pe extractele totale care conţin în majoritate doar proteinele citoplasmatice, ci şi pe formaţiunile intracelulare. Cercetate separat, acestea pot prezenta caractere proteice specifice, copleşite în extractele totale de cantitatea mare de proteine citoplasmatice solubile.

1. SINTEZA PROTEINELOR ORGANOSPECIFICE

Apariţia proteinelor specifice fiecărui organ poate fi explicată prin cunoştiinţele actuale privitoare la sinteza proteinelor, apelînd la ipoteza lui Brachet asupra mecanismului de diferenţiere embrionară [2]. Producţia de ARN mesageri începe după fecundare. În cursul coacerii şi apoi al germinaţiei, aceşti ARN mesageri se fixează pe ribozomi şi activează gradientul de sinteză proteică. Apariţia proteinelor organospecifice ar rezulta din competiţia dintre ribozomii încărcaţi cu diferiţi ARN mesageri. Formarea polizomilor a fost semnalată în embrionii de grîu

în cursul germinației [3]. Experiențe pe embrioni de bumbac germinat [4] au furnizat date care sugerează că sinteza proteică observată în această perioadă este dirijată de un ARN mesager care există în sămînța negerminată și care este stabil, avînd o viață relativ lungă. Această concluzie se sprijină pe constatarea că actinomicina D nu este capabilă să inhibe încorporarea leucinei ^{14}C în proteinele solubile ale embrionului în dezvoltare și nici nu determină o micșorare a populației de poliribozomi în timpul primelor 16 ore de la germinație [1].

Desigur că nu se poate preciza dacă ARN-ul mesager și ribozomial gata formați în sămînța matură inițiază sinteza proteinelor organospecifice sau pe cea a proteinelor întregului embrion. Experiențele lui Loening [6] aduc dovezi că în radicula de mazăre recoltată în a 2-a zi de la germinație s-ar sintetiza un ARN mesager care se distruge rapid. S-ar putea, deci, ca sinteza proteinelor organospecifice să fie sub controlul unui ARN mesager instabil. De altfel, autorul mai sus menționat presupune că producerea acestui ARN mesager ar putea fi controlată prin mecanisme de inducție-represie descrise de Jacob și Monod [7] și ar reprezenta unul din mecanismele de control ale diferențierii celulare.

Inhibitorii specifici ai sintezei ARN și proteinelor produc și o blocare a creșterii și diferențierii morfologice. Astfel, Key [8] a reușit să perturbe — și chiar să oprească — ritmul normal al elongației celulare la hipocotilul de soia cu ajutorul actinomicinei D, 8-azaguanidinei și puromicinei. Autorul consideră că nu toate proteinele sintetizate sînt esențiale pentru procesul de elongație celulară, ci numai acelea care sînt asociate cu schimbarea funcțiunilor metabolice și a activității celulelor plantei. Cum aceste proteine se sintetizează pe matrițe de ARN mesager instabile, ele vor fi supuse unei inhibiții marcate prin substanțele folosite. Deci, proteinele și ARN-ul mesager asociat, care sînt esențiale pentru procesul de creștere celulară, ar putea avea un turnover mai rapid decît restul proteinelor și ARN-ul celular.

Procesul caracteristic care acompaniază sau precede apariția noilor organe este sinteza proteinelor organospecifice. Este greu de precizat dacă această sinteză se declanșează brusc, într-un moment dat al dezvoltării organului, și determină apariția funcțiilor sale specifice, sau dacă ea are loc cu o intensitate foarte scăzută și în fazele timpurii, în care nu sînt manifeste funcțiile caracteristice organului. Această ultimă posibilitate este susținută în lucrarea lui Bonner și colab. [9], care dovedește că în frunze și rădăcină există mecanismele genetice care controlează sinteza proteinelor de rezervă din semințe, numai că această sinteză este în mod normal represată. Deci, apariția proteinelor organospecifice (ale seminței) ar putea fi înțeleasă ca un fenomen de derepresare a unui mecanism de sinteză existent în tot ciclul vital.

Apariția proteinelor organospecifice la plante nu a fost studiată aproape deloc. De altfel chiar natura fizico-chimică a proteinelor din diferite organe este atît de puțin investigată încît prezentarea modificărilor care afectează caracterul proteic în cursul creșterii și dezvoltării plantelor trebuie să se limiteze la frunză, singurul organ mai bine caracterizat din acest punct de vedere.

Datele imunochimice obținute în laboratorul nostru [10], [11] asupra apariției antigenelor organospecifice în procesul creșterii și dezvoltării frunzelor de bob au arătat că caracterul proteic al frunzelor embrionare se apropie brusc de acela al frunzelor mature (fig. 1).

Examinînd imunoelectroforegramele proteinelor extrase din frunze de diferite vîrste, se observă că serul imun antifrunză matură este capabil să reacționeze cu proteinele din frunzele embrionare ale seminței negerminate, dînd 3 linii slabe de precipitare. Cum și proteinele totale din frunzele mature sînt capabile să reacționeze cu serul imun antiembrion negerminat [10], este tentant să se considere că aceste reacții încrucișate sînt determinate de prezența în cantitate mică a unor antigene, în toate fazele de dezvoltare și în toate organele (semințe, rădăcină, tulpină

[1] Vezi, în contrast, lucrările lui Levinthal și colab. [5] care au observat că la *B. subtilis*, în timpul blocării sintezei ARN-ului mesager cu actinomicină D, mesagerul preexistent este dezintegrat rapid, sinteza proteică scăzînd într-o proporție considerabilă.

şi frunză). Ele pot fi considerate ca antigene comune diferitelor organe ale plantei. Această generalizare se sprijină şi pe datele cantitative obţinute de Kloz şi colab. (12) pe plante de fasole (tabela 1).

Tabela 1

Mărimea reacţiilor încrucişate între proteinele din cotiledoanele, plantula şi frunzele de fasole* (după [12])

Antiser faţă de / Antigen	Proteine de rezervă din cotiledoane	Proteine din plantulă**	Proteine din frunză***
Proteine de rezervă din cotiledoane	100	8,9	9,2
Proteine din plantulă	—	100	23,7
Proteine din frunză	8,0	53,4	100

* Exprimarea procentuală a rezultatelor considerînd reacţia omologă 100%.
** Plantulă în vîrstă de 1 săptămînă, fără cotiledoane.
*** Frunzele au fost recoltate de pe plante în vîrstă de 5 săptămîni.

Datele arată că o parte mică, dar semnificativă, din proteinele (antigenele) foliare este capabilă să reacţioneze încrucişat cu proteinele din cotiledoane, şi invers. Totodată, se observă că după o germinaţie de 7 zile apare deja în plantulă o parte din caracterul proteic al frunzei mature, reacţia încrucişată dintre plantulă şi frunză fiind jumătate din cea omologă.

Persistenţa unor proteine în toate fazele de dezvoltare ale plantei este atestată şi de distribuţia fitaglutininei (lectinei) la fasole (*lima bean*). Ea există în cantităţi mari în sămînţă, dar se menţine, în cantităţi mici, şi în diferitele organe ale plantei, formate după germinaţie [13].

Apariţia caracterului proteic specific frunzei mature poate fi urmărită la nivelul diferitelor antigene în imunoelectroforegramele din figura 1. Se observă că în frunzele embrionare apare, la 4 zile după începerea germinaţiei, o linie de precipitare în plus. Ea ar putea surprinde mai degrabă un fenomen hidrolitic decît sinteza unui antigen timpuriu organospecific [14]. Această posibilitate este sugerată şi de forma şi poziţia arcului de precipitare, care nu se regăseşte în imunoelectroforegrama proteinelor din frunza matură. De altfel, în frunzele de bob în dezvoltare se menţin un timp scurt produşi de hidroliză proteică de natură necunoscută (fracţiunea 6 din figura 2).

Imunoelectroforegramele se complică brusc între a 11 şi a 18 zi de la germinaţie, apropiindu-se de imaginea complexă dată de frunza matură. Identitatea se realizează numai cînd frunza a căpătat o structură morfologică caracteristică maturităţii (23—35 zile). Deşi antigenele organospecifice apar pe rînd, într-o fază relativ tîrzie a morfogenezei, ele capătă într-un timp relativ scurt structura caracteristică maturităţii. Concluziile noastre pot fi apropiate de cele ale lui Burke şi colab. [15], care, studiind proprietăţile antigenice ale diferitelor organe ale embrionului de găină, au ajuns la concluzia că antigenele specifice de organ nu apar în procesul dezvoltării decît în momentul în care organul capătă structura morfologică ce-i este caracteristică în starea adultă. La fel, Koniuhov [16] a arătat că antigenele specifice cordului de găină apar abia în ziua a 4-a de incubaţie şi cantitatea lor creşte în procesul dezvoltării. Cercetarea morfologică efectuată în paralel a arătat că apariţia antigenelor specifice organului coincide cu perioada de restructurare morfologică radicală a cordului, ca organ al circulaţiei sanguine. Trebuie arătat însă că constatările prezentate mai sus sînt în contradicţie cu alte experienţe, făcute pe cristalin sau pe inimă (vezi de exemplu [16]), care arată că antigenele organospecifice pot să apară cu mult înainte ca organul să-şi capete structura definitivă [2].

[2] La interpretarea rezultatelor trebuie luat în seamă faptul că specificitatea antigenică depinde de grupările determinante, şi nu de întreaga moleculă, şi că molecule asemănătoare din punct de vedere imunochimic nu trebuie să fie în mod necesar identice şi din punctul de vedere al întregii lor constituţii chimice. Modul în care această limitare se poate repercuta asupra interpretării reactivităţii imunochimice a proteinelor în diferite stadii de dezvoltare poate fi găsit în lucrarea de sinteză a lui Eber [17].

Din păcate, cei mai mulţi autori care au studiat proprietăţile antigenice ale ţesuturilor animale în dezvoltare nu au făcut legătura între apariţia antigenelor organospecifice şi particularităţile morfofiziologice ale organului în dezvoltare. La frunze, apariţia antigenelor organospecifice ar trebui corelată cu dezvoltarea mezofilului, apariţia fotosintezei, trecerea de la sistemul respirator citocromic la cel polifenoloxidazic etc.

Modificarea componentelor antigenice pe măsura dezvoltării embrionului este însoţită de interacţiunea imunologică a proteinelor ţesuturilor aflate în diferite stadii embriogenetice, fapt care se manifestă, *in vitro*, prin aglutinarea reciprocă a celulelor diferitelor foiţe embrionare [18]. Aceste experienţe au fost generalizate de Vyazov [19], [20], care a arătat că extractele din ţesuturile neoformate intră într-adevăr într-o reacţie antigen-anticorp cu ţesuturile stadiilor embriogenetice mai timpurii. Jukov-Verejnikov [21] crede că rolul de anticorpi îl îndeplinesc proteinele nou formate, care sînt capabile să reacţioneze cu antigenele ontogenetic mai bătrîne. Se exercită astfel o acţiune inhibitoare asupra tipurilor precedente de biosinteză proteică, asigurînd embrionului o dezvoltare tipică pentru specia respectivă. Începutul sintezei unor componente proteice poate deci opri sinteza altor componente, dirijînd astfel evoluţia embrionului în direcţiile morfologice determinate genetic.

Şi în cursul evoluţiei ontogenetice a plantelor se pot evidenţia asemenea interacţiuni. Astfel, în laboratorul nostru (date nepublicate) s-au pus în evidenţă reacţii de precipitare în gel între proteinele din frunze de diferite vîrste şi proteinele din axele embrionare şi cotiledoane. Din păcate, aceste reacţii nu se datoresc numai interacţiunilor proteină/proteină şi sînt mascate în bună măsură de reacţii nespecifice (reacţii între extractele din frunze de la o specie şi din axele embrionare de la alte specii).

2. PROTEINE DIN CLOROPLASTE ŞI CITOPLASMĂ

Pentru a cunoaşte caracterul proteic al frunzelor este necesar să se ţină seama de prezenţa intracelulară a unor formaţiuni caracteristice — cloroplastele — care imprimă celulei foliare caractere funcţionale unice (fotosinteză). Caracterul proteic al frunzelor este un mozaic la care participă, în măsură inegală, toţi componenţii proteici care provin din formaţiunile intracelulare: cloroplastele, citoplasma, microzomii, mitocondriile, nucleul, membrana şi, poate, la celulele bătrîne, vacuolele. Măsura în care fiecare din formaţiunile enumerate mai sus participă la alcătuirea caracterului proteic foliar depinde de masa lor şi de capacitatea agenţilor de extragere de a pune în evidenţă grupurile de proteine caracteristice fiecărei formaţiuni.

În prezent, dintre proteinele foliare sînt mai bine cunoscute cele ce provin din citoplasmă şi din cloroplaste. Deşi mitocondriile şi microzomii din frunze pot fi preparate într-o stare de puritate satisfăcătoare, caracterizarea fizico-chimică a proteinelor lor solubile nu a atras pînă acum atenţia decît lui Setterfield şi colab. [22], care au efectuat un studiu interesant asupra proteinelor bazice din ribozomii mugurilor plantulelor de mazăre. Cît priveşte proteinele vacuolare, am arătat mai demult [23] că ele diferă de cele citoplasmatice din punct de vedere electroforetic, polarografic, al solubilităţii în sulfat de amoniu şi al compoziţiei în aminoacizi. Proteinele vacuolare sînt probabil produşi de hidroliză ai proteinelor citoplasmatice, rezultaţi în urma stimulării catepsinelor prin îmbătrînire [24] şi eliminaţi în lichidul vacuolar.

Cloroplastele sînt structurile intracelulare care conţin majoritatea proteinele foliare. Astfel, la multe specii s-a arătat că peste 60% din proteinele foliare provin din plastide. Capacitatea plastidelor de a ceda uşor în cursul extracţiilor proteinele solubile a trecut multă vreme neobservată şi a condus la concluzia greşită că fracţiunea proteică I provine din citoplasmă [25],

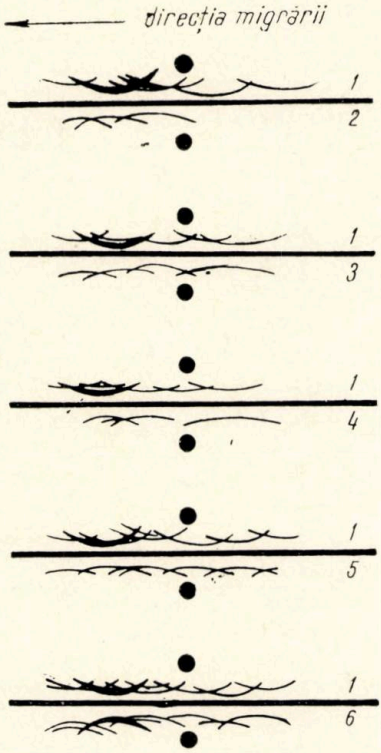
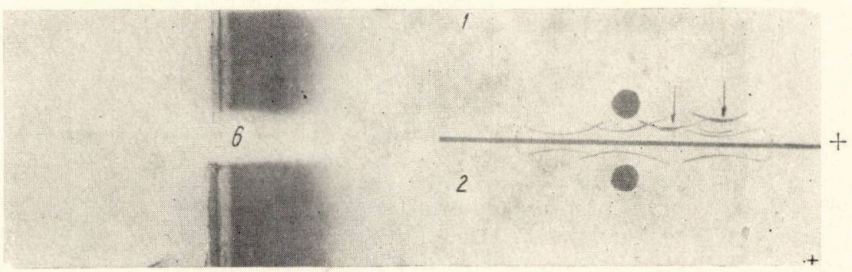


Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a proteinelor din frunzele de bob în diferite faze de dezvoltare [11]. S-a utilizat un ser de iepure antifrunză de bob.
1 = frunză matură; *2* = frunză embrionară;
3 = frunză de 4 zile; *4* = de 11 zile;
5 = de 18 zile; *6* = de 23 de zile.

Fig. 2. — Apariția antigenelor specifice frunzelor verzi în frunzele etiolate de bob, prin iluminare [10]. S-a utilizat serul de iepure antifrunză (verde) de bob. Antigenele specifice sînt indicate cu săgeată.
1 = lumină; *2* = întuneric; 6 = fragment de hidroliză]



[26]. Lyttleton şi Ts'o [27] au dovedit că fracţiunea proteică I a frunzelor verzi este localizată în cloroplaste, constatare confirmată apoi şi de alţi cercetători. Zucker şi Stinson [28] au arătat că rezultatele contradictorii cu privire la compoziţia în proteine, acizi nucleici şi enzime a plastidelor este determinată de dificultăţile de izolare a cloroplastelor în condiţii de nealterare. Astfel, tamponul fosfat, extractant slab pentru proteinele din cloroplastele izolate, extrage puţin din proteinele frunzelor mature de *Oenothera*, în timp ce tamponul borat, extractant eficient al proteinelor cloroplastice, este de asemenea şi un bun extractant al proteinelor din întreaga frunză. De aceea, într-un extract foliar cu tampon borat cea mai mare parte a proteinelor provine din cloroplaste şi nu din citoplasmă. Această experienţă atrage atenţia că în toate cercetările care au utilizat extracte foliare totale, caracterele proteice stabilite nu numai că nu sînt ale citoplasmei, ci, dacă s-au folosit extractanţi electivi pentru plastide, ele sînt în majoritate ale cloroplastelor.

Caracterul proteic al cloroplastelor şi citoplasmei prezintă importante asemănări. Melik-Sarkisian şi colab. [29], comparînd sub aspect fizico-chimic proteinele citoplasmatice şi cele cloroplastice din sfeclă (*Beta vulgaris*) şi spanac (*Spinacia oleracea*), au ajuns la concluzia că proteinele citoplasmatice şi cele cloroplastice sînt foarte asemănătoare ca natură chimică şi aparţin probabil aceluiaşi grup de proteine. Că în cloroplaste şi citoplasmă pot exista tipuri de proteine care să le fie comune o sugerează lucrările lui Lyttleton şi Ts'o [27], care au ajuns la concluzia că numai 65—70% din fracţiunea I a frunzelor de spanac provine din cloroplaste, restul avînd o origine citoplasmatică. Totuşi, nu este exclus ca procentul de 30—35% din fracţiunea I să nu reprezinte altceva decît procentul de cloroplaste alterate în cursul prelucrării şi care şi-au pierdut proteina proprie.

Faptul că fracţiunea I a fost găsită în foarte multe specii şi că la nivelul ei s-au semnalat asemănări imunochimice frapante chiar între specii foarte îndepărtate sub aspect evolutiv [30], asociat cu constatarea că fracţiunea I este înzestrată cu activitate enzimatică nemijlocit implicată în fotosinteză (ribulozo-1,5-difosfat-carboxilaza) lasă să se întrevadă că prezenţa ei în regnul vegetal este direct legată de fotosinteză şi, deci, de plastidele în care are loc acest proces. În plus, cercetările lui Kupke [31] au arătat că fracţiunea I este identică cu proteina cu constanta de sedimentare 18 *S*, care leagă protoclorofila[3]. Este posibil deci ca fracţiunea I să fie implicată în mai mult de o singură activitate în frunză. De altfel, este neeconomicos ca o proteină care reprezintă cam 25% din cloroplastul uscat să nu aibă decît o singură funcţie. În sfîrşit, nu este sigur că fracţiunea I este formată dintr-o singură specie de molecule. Deşi n-a putut fi separată prin ultracentrifugare [31], electroforeză [25], [26] şi cromatografie pe DEAE-celuloză [32], totuşi tratarea cu uree 2M sau aducerea la un pH alcalin permite disocierea componentului proteic în subunităţi de 2—5 *S*, care păstrează capacitatea de fototransformare [31].

Existenţa unui caracter proteic cloroplastic distinct este sugerată şi de experienţele asupra sintezei proteice în cloroplaste, care au dovedit că plastidele izolate şi *in situ* sînt capabile să încorporeze în proteine aminoacizi radioactivi [33], [34], [35]. Sisakian şi colab. [36] au izolat din cloroplastele plantelor de mazăre o fracţiune ribozomială care încorporează în proteină aminoacizi radioactivi, fără adăugarea cofactorilor uzuali ai sintezei proteice în mixtura de incubat.

Ribozomii cloroplastelor diferă de ai restului citoplasmei prin coeficientul lor de sedimentare şi prin sensibilitatea încorporării glicinei ^{14}C faţă de ribonuclează. Sinteza proteică poate fi inhibată prin cloramfenicol, puromicină, actinomicină D şi alţi inhibitori cunoscuţi ai sintezei proteice [36]. Încorporarea radioactivităţii aminoacizilor în proteinele solubile din cloroplaste are loc într-o manieră diferită de cea din citoplasmă [37]. Se constată că apariţia radioactivităţii în proteinele cloroplastice are loc înainte de încorporarea în proteinele citoplasmatice, care prezintă un lag de 2 minute.

[3] S-a determinat că fiecare moleculă din fracţiunea I (Gm = 300 000) leagă în jur de 80 de molecule de (proto)clorofilă.

În plastide s-au pus în evidenţă toţi factorii necesari unei sinteze proteice independente, ca : un fond (*pool*) aminoacidic relativ independent [38], enzimele de activare a aminoacizilor [39], [36], ARN solubil [40], [36] şi ADN [41], [42]. Prezenţa ADN-ului şi a sintezei de ARN dependente de ADN [43] este un important sprijin pentru concepţia că există o autonomie genetică a plastidelor şi un autocontrol al diferenţierii lor. Tot în acest sens pot fi invocate şi experienţele în care s-a observat moştenirea caracterului cloroplastic în unele cazuri de mutaţie, indicînd continuitatea plastidelor prin celula-ou, la plante superioare [44].

Din aceste rezultate s-ar putea trage concluzia că în celulele foliare există două sisteme de sinteză proteică, diferite, net delimitate : sinteza în cloroplaste şi sinteza în citoplasmă. Sub acest aspect s-ar putea face o apropiere cu situaţia existentă în seminţe unde, de asemenea, alături de sistemul de sinteză proteică citoplasmatică, există sistemul de sinteză al proteoplastelor, care generează proteinele de rezervă [45]. Ca şi la seminţe, s-ar putea ca proteinele sintetizate de cele două sisteme să difere între ele şi să existe tipuri citoplasmatice şi cloroplastice specifice, care, alături de unele componente comune, să prezinte şi altele specifice. Aceste componente specifice ar putea fi cuprinse în fracţiunea proteică foliară II, care apare eterogenă şi are o origine încă neprecizată.

3. SINTEZA PROTEICĂ DEPENDENTĂ DE LUMINĂ

Efectul primar al luminii asupra creşterii, cunoscut sub termenul de fotomorfogeneză, dovedeşte că există un control al creşterii, dezvoltării şi diferenţierii unei plantule, exercitat de lumina vizibilă, independent de fotosinteză [46], [47]. S-a putut arăta că procesul de fotomorfogeneză se manifestă graţie unei cromoproteine solubile, prezentă în citoplasmă şi mitocondrii [48], şi care alcătuieşte sistemul fotoreactiv principal al procesului. Transformarea se realizează prin iradiere cu lumină roşie : $Pr \underset{730m\mu}{\overset{660m\mu}{\rightleftharpoons}} Pf$. Forma Pf este cea activă fiziologic ; imediat ce devine disponibilă pentru organism, ea declanşează reacţiile care duc la morfogeneză. Astfel, la plantele de muştar, sistemul cromoproteidic, împreună cu un alt sistem pigmentar mai puţin studiat [46], controlează următoarele transformări morfologice : inhibarea lungirii hipocotilului, mărimea cotiledoanelor, formarea elementelor traheare în sistemul circulator al hipocotilului, formarea perişorilor de-a lungul hipocotilului, creşterea reacţiilor geotropice etc.

Calea prin care sistemul fotocromic intervine în morfogeneză este insuficient cunoscută. Cercetările efectuate pînă acum sînt mai degrabă capabile să arate care sînt procesele prin care sistemul fotocromic nu intervine în morfogeneză, decît să desemneze procesele responsabile de acest efect. Faptul că fotomorfogeneza are loc simultan cu o intensă sinteză proteică, în condiţii în care azotul total al plantelor rămîne constant, pare să indice că cromoproteida controlează reacţiile de bază ale metabolismului acizilor nucleici şi al proteinelor în celule [46]. Există cercetări care au arătat că lumina este necesară pentru formarea normală a unor enzime însă nu se cunoaşte în ce măsură această sinteză este un rezultat direct sau indirect al formării cromoproteidei active.

Alături de fenomenul de morfogeneză, la formarea proteinelor organospecifice participă şi fotosinteza. În literatură există numeroase lucrări care atestă dependenţa sintezei proteice, la nivelul frunzei, de iluminare. Limitîndu-ne numai la cîteva, vom aminti lucrările lui Brawerman şi colab. [49], [50], care au arătat că în celulele incolore de *Euglena gracilis* iluminarea iniţiază sinteza unei mari cantităţi de proteine cloroplastice. Acest fenomen este acompaniat de o creştere considerabilă a conţinutului în ARN, care precede de altfel sinteza proteinelor. Este de notat că ARN-ul format diferă prin compoziţia sa nucleotidică de ARN-ul obţinut din celulele incolore. Este vorba de un ARN ribozomial care se formează în plastidele verzi. Sinteza ADN-ului, ARN-ului şi proteinelor a fost semnalată şi în frunzele cotiledonare ale ridichilor

[51]. Se constată că cantitatea substanțelor formate este dependentă de intensitatea luminii (în anumite limite).

Sinteza proteică dependentă de lumină are loc și în cloroplastele izolate. Acest lucru s-a demonstrat prin încorporarea CO_2 marcat în proteinele cloroplastelor [34]. Dintre componentele proteice ale cloroplastelor s-a urmărit evoluția fracțiunii I. S-a constatat că la plantulele de grîu, ținute la întuneric timp de 5 zile și apoi iluminate 20 de ore, proporția procentuală a fracțiunii I crește de la 18% la 52% [52]. Trebuie remarcat însă că fracțiunea I (notată de D. Kupke 18 *S* [31]) apare chiar și în frunzele ținute la întuneric, însă cantitatea formată, ca și viteza creșterii sînt mai mici [31].

Studiind dependența de lumină a conținutului în proteină și ARN a diferitelor formațiuni intracelulare, Rhodes și Yemm [53] au ajuns la concluzia că doar în plastide se constată o dependență de lumină a sintezei proteice.

Apariția proteinelor cloroplastice (inclusiv a fracțiunii I), ca răspuns la iluminare, poate fi pusă în legătură cu schimbările morfologice care pot fi surprinse la microscopul electronic, cu ocazia trecerii de la proplastide la plastide [54]. Diferențierea morfologică a cloroplastelor în funcție de lumină constă în principal în apariția lamelei primare și în diferențierea granei [55], [56]. Fără fotosinteză, sistemul lamelar al cloroplastelor se dezintegrează. Fenomenul este reversibil, deoarece iluminarea reorganizează structura. Dezvoltarea sistemului lamelar începe paralel cu creșterea cantității de proteină sintetizată, ceea ce lasă ușor să se întrevadă că sinteza proteică determină organizarea și complicarea structurii cloroplastelor. De altfel, sistemul lamelar este alcătuit din lipoproteine, iar matricea conține o bună parte din enzimele acvosolubile localizate în cloroplaste.

Dar lumina influențează nu numai cantitatea proteinelor, ci și calitatea lor. Astfel, efectuînd un studiu comparativ asupra caracterului proteic al plastidelor fotosintetizante și nefotosintetizante, Sisakian și Melik-Sarkisian [57] au evidențiat variații ale calității proteinelor. La plantele etiolate se constată o scădere a mobilității electroforetice a tuturor fracțiunilor proteice cloroplastice (inclusiv a fracțiunii I). Această comportare a fost pusă pe socoteala scăderii cantității aminoacizilor ciclici și ramificați și a creșterii argininei și lizinei în proteinele cloroplastice de porumb și a celor citoplasmatice de soia, la plantele etiolate. Asimetria structurală a fracțiunii cloroplastice notate α (fracțiunea I?) este mai pronunțată la cloroplastele care fac fotosinteză. Faptul că viscozitatea α-cromoproteinei din cloroplastele verzi este mai mare decît a celei preparate din plantele etiolate îi fac pe autori să presupună că dezvoltarea sistemului lamelar are loc prin agregarea moleculelor de α-cromoproteină, care se leagă cap la cap. Această presupunere arată că procesul de diferențiere a cloroplastelor are loc în două etape : sinteza unor unități proteice și apoi agregarea lor.

Aceste cercetări lasă să se înțeleagă că fotosinteza nu inițiază formarea unor proteine specifice, ci mărește doar viteza sintezei lor. Modificările calitative găsite de autorii mai sus citați [57] pledează mai mult pentru o restructurare moleculară decît pentru apariția unor proteine specifice noi, inexistente în planta etiolată.

Totuși, posibilitatea formării unor proteine specifice în legătură directă cu începerea fotosintezei nu poate fi îndepărtată fără a examina problema apariției proteinelor funcționale care intervin în procesul fotosintezei. Astfel, în cloroplaste s-a pus în evidență o ATP-ază a cărei activitate este integral dependentă de lumină [58]. Numeroase alte enzime care intervin în fazele de lumină și întuneric ale fotosintezei s-au putut evidenția numai în țesuturile capabile de fotosinteză (vezi, de exemplu [56], [54]). Dată fiind natura proteică a acestor enzime, apariția lor în urma iluminării marchează nu numai apariția unei funcții biochimice noi, dar și a unui caracter proteic nou, inexistent la plantele etiolate.

Cercetarea imunochimică a apariției proteinelor specifice frunzelor, în urma iluminării, a condus de asemenea la rezultate contradictorii.

Rosenblat-Lichtenstein, Lieske și Elmore (citați de [50]) au arătat că starea de etiolare se reflectă în numărul de antigene proteice din materialul cercetat. Ei au atras atenția asupra unor diferențe, determinabile serologic, între formele incolore și cele verzi ale algelor unicelulare. Newton [61], [62] a arătat că cromatozorul bacteriei *Rhodospirilla rubrium* conține două antigene proteice, dintre care unul există numai la lumină și se formează în procesul de fotosinteză. S-a demonstrat că antigenul „luminos" este format din mai multe subunități cu greutate moleculară mică. La lumină, aceste subunități sînt asociate, iar la întuneric ele sînt disociate, prin desfacerea unor legături disulfidice. Sub formă disociată, antigenul nu mai reacționează cu anticorpul corespondent; de aceea el nu poate fi recunoscut în cromatozorul bacteriei crescute la întuneric. Lewis și colab. [64] au arătat că, la lumină, compoziția proteinelor din cloroplastele de *Euglena* se schimbă rapid, acumulîndu-se antigene caracteristice.

La plantele superioare aceste constatări au fost verificate în laboratorul nostru [10], [11]. Folosind analiza imunoelectroforetică, s-a arătat că, în urma iluminării, în frunzele etiolate de bob apar două antigene noi, care sînt prezente numai în frunzele verzi mature (fig.2).

Deoarece existența proteinelor foliare s-a făcut cu tampon borat, care dezintegrează cloroplastele [26], antigenele semnalate pot proveni nu numai din citoplasmă, ci și din cloroplaste. De fapt, provenienta lor cloroplastică este chiar mai probabilă.

Rezultate diferite au obținut S.G. Wildman, M. Parker și S.M. Campbell, într-o lucrare nepublicată, efectuată în 1948 și citată de Bonner [64]. Aceștia au arătat că proteinele citoplasmatice ale frunzelor etiolate sînt similare cu cele ale plantelor verzi; chiar dacă frunzele etiolate pierd clorofila și o cantitate apreciabilă din proteinele cloroplastice, proteinele citoplasmatice nu prezintă modificări. De fapt, aceste cercetări nu exclud ca la nivelul proteinelor cloroplastice să existe totuși deosebiri între frunzele verzi și cele etiolate, deoarece modificările s-au studiat numai la nivelul proteinelor citoplasmatice. Dat fiind că la epoca efectuării acestor cercetări era greșit atribuită unor proteine originea citoplasmatică și fiindcă autorii au urmărit distrugerea antigenelor prin etiolare și nu apariția lor prin iluminare (fenomene contrarii care nu trebuie să fie și echivalente), concluziile trase rămîn discutabile.

Nici Capon și Bogorad [65], [66] n-au putut semnala schimbări detectabile prin imunodifuzie, în urma iluminării frunzelor etiolate de fasole (*Phaseolus vulgaris*). În acest caz însă, în atenția cercetătorilor mai sus-citați a stat complexul proteic care leagă protoclorofila (fracțiunea I). Se știe însă că această fracțiune există și în frunzele etiolate [52], precum și că iluminarea ar putea provoca agregarea unor subunități deja existente, fără apariția unei structuri antigenice noi [31], [57], [63]. Astfel, Tadashi [67] a putut evidenția în cloroplastele din frunzele de spanac o proteină care posedă legături disulfidice care pot fi reduse prin lumină. Or, faptul că subunitățile proteice sau lanțurile polipeptidice ce posedă grupări sulfhidrilice libere se pot agrega, refăcînd structuri inițiale, este cunoscut (vezi de exemplu [68]).

Aceste constatări, ca și precizarea pe care am făcut-o că apariția unor antigene noi ar putea fi cauzată și de o restructurare a grupărilor determinate într-o populație moleculară deja existentă, arată că, pentru a avea certitudinea că lumina induce sinteza proteinelor specifice, mai sînt necesare experiențe.

4. MODIFICAREA CARACTERULUI PROTEIC PRIN ÎMBĂTRÎNIREA FRUNZELOR

La scurt timp după ce frunza a atins structura caracteristică maturității, se constată o scădere a cantității de proteină, fenomen care se accentuează pe măsură ce procesul vegetativ avansează (vezi de exemplu [69], [70]). Scăderea cantității de proteine cu vîrsta poate fi provocată fie de o sinteză proteică mai redusă (uzarea „fabricii de proteine"), fie de o creștere a hidrolizei proteinelor, fie, în sfîrșit, de ambele procese acționînd simultan.

Sinteza proteică mai redusă ar putea fi cauzată de îmbătrînirea mecanismului sintetic; s-a arătat că pierderea de proteină este întovărăşită (dacă nu chiar precedată) de o descompunere a ribozomilor şi o migrare a metaboliţilor de la celulele mai bătrîne la cele mai tinere [71]. De asemenea, micşorarea cantităţii substratului disponibil poate explica scăderea cantităţii de proteine; îndepărtarea organelor consumatoare de azot (de ex. sămînţa) de pe plante şi suplimentarea adecvată cu azot, prin rădăcină previne scăderea cantităţii de proteină din frunzele bătrîne [72].

Scindarea proteinelor din frunze în raport cu vîrsta a fost studiată atît pe frunze *in situ*, cît şi pe frunze detaşate. S-a observat creşterea azotului solubil şi translocarea lui în alte părţi ale plantei (la plantele anuale, în seminţe). Creşterea ritmului de hidroliză ar putea fi determinată nu numai de activarea catepsinelor intracelulare pe măsură ce o frunză îmbătrîneşte, ci şi de modificarea structurii proteinelor, care devin astfel mai uşor atacabile de către catepsinele preexistente în celulă. Îmbătrînirea moleculelor proteice a fost observată la hemoglobină şi colagen [73]. Apariţia unor schimbări chimice care diferenţiază moleculele mai bătrîne de cele tinere poate fi cauzată de : cîştigarea sau pierderea unor grupări, reducerea grupărilor disulfidice sau oxidarea celor sulfhidrilice, deplieri parţiale cu tranziţie de configuraţie, conversiunea unui aminoacid prin altul etc. [73].

Astfel de modificări structurale ar putea avea loc în cursul îmbătrînirii şi la nivelul proteinelor foliare. Sisakian şi Melik-Sarkisian [57] de exemplu, au observat la sfeclă că pe măsură ce procesul de vegetaţie înaintează, se micşorează mobilitatea electroforetică a proteinelor cloroplastice, pe cînd aceea a proteinelor leucoplastice (din rădăcină) creşte. În leucoplaste tabloul electroforetic suferă modificări calitative, existînd o tendinţă de simplificare a complexului proteic analizat [74].

În cursul îmbătrînirii, constanta de sedimentare a proteinelor cloroplastice creşte, ceea ce dovedeşte că moleculele se măresc sau se agregă. Această agregare poate fi rezultatul modificării unor grupări reactive din molecula proteică. A.V. Blagovescenski crede că îmbătrînirea individuală este legată de creşterea mărimii moleculelor proteice. Cum acest proces este însoţit de o scădere a solubilităţii şi de o modificare a tensiunii superficiale, el poate determina micşorarea capacităţii proteinelor de a participa la procesele metabolice ale celulei. Pe măsură ce ele devin din ce în ce mai puţin implicate în metabolism, proteinele sînt atacate şi hidrolizate de catepsine, care „recunosc" structura lor chimică modificată.

Este bine cunoscut că, pe o plantă oarecare, nu toate frunzele au aceeaşi vîrstă, ci cu cît sînt mai apropiate de conul de creştere, cu atît sînt mai tinere. Cercetarea electroforetică a componentelor proteice pe frunzele de *Xantium* [75], în raport cu vîrsta fiziologică a frunzei, a arătat că există importante deosebiri cantitative între frunzele complet extinse (*fully expanded*) şi cele aflate abia în stadiul de apex. Astfel, componentul majoritar în apex scade de la o valoare relativă de 43—47% pînă la 11—14%. Este de notat că aspectul electroforegramelor nu diferă semnificativ dacă recoltarea frunzelor în diferite stadii s-a făcut de pe planta în vîrstă de 16 zile sau de 44 de zile. Această comportare subliniază încă o dată necesitatea ca la studiul caracterului proteic în funcţie de vîrstă să se aibă în vedere că frunzele de pe plante de diferite vîrste au, la rîndul lor, vîrste diferite. Mai mult, chiar diferitele părţi ale unei frunze pot avea vîrste diferite, diferenţierea ţesutului primar din frunză, în ţesuturi definitive, făcîndu-se de la vîrf spre bază (bazipetal). Componenţa proteică în raport cu vîrsta frunzei (la dafodil) a arătat utilitatea disocierii frunzei în părţi mai tinere şi mai bătrîne [76].

În sfîrşit, poate fi reţinut faptul că pierderea de proteină şi îmbătrînirea pot fi oprite prin kinetină sau alte purine de acest tip [71], [77]. Aplicarea lor locală la frunzele detaşate determină o menţinere şi chiar o creştere a culorii verzi şi a nivelului proteic la locul aplicării. Kinetina, ca şi auxina şi alţi hormoni vegetali acţionează asupra sintezei proteice prin intermediul ARN-ului [78]. [79]. Stimularea rapidă a sintezei ARN-ului, în special a celui ribozomial,

a fost observată de mai mulți autori [80], [81]. Aceste experiențe sugerează că sinteza proteică este sub control hormonal. S-ar putea ca locul de sinteză a hormonilor să fie extrafoliar iar îmbătrînirea să fie determinată de o încetinire a afluxului de hormoni în frunze.

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

Prezentat la redacție la 27 iunie 1967

BIBLIOGRAFIE

1. S. T. C. Wright, Nature, **185**, 82 (1960).
2. J. Brachet, J. cell. comp. Physiol., **60**, 17 (1962).
3. A. Marcus, J. Feeley, J. biol. Chem., **240**, 1675 (1965).
4. L. Dure, L. Watets, I. Vinogradov, J. Biophys. Biochem. Cytol., **2**, 451 (1956).
5. C. Levinthal, A. Keynan, A. Higa, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **48**, 1631 (1962).
6. E. Loening, Nature, **195**, 467 (1962).
7. F. Jacob, J. Monod, J. mol. Biol., **3**, 318 (1961).
8. J. L. Key, Plant Physiol., **39**, 365 (1964).
9. J. Bonner, R. C. Huang, R. V. Gidlen, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **50**, 893 (1963).
10. V. Gheție, L. Buzilă, Biol. plant. (Praha), **6**, 202 (1964).
11. V. Gheție, L. Buzilă, St. cerc. biochim., **6**, 49 (1963).
12. J. Kloz, V. Turkova, E. Klozova, Biol. Plant., **2**, 126, (1960).
13. E. W. Martin, E. Wasczenko-Zacharczenko, W. C., Boyd, K. F. Schertz, Ann. Bot., **28**, 319 (1964).
14. V. Gheție, St. cerc. biochim., **9**, 91 (1966).
15. V. Burke, N. P. Sullivan, H. Petersen, R. Reed, J. Infect. Dis., **74**, 225 (1944).
16. B. F. Koniuhov, Usp. sovr. biol., **45**, 97 (1958).
17. J. P. Ebert, *The acquisition of biological specificity*, în J. Brachet și A. E. Mirsky, *The Cell*, Academic Press, New York—London, 1961, **II**, 619.
18. J. Holtfreter, Arch. exp. Zell Physiol., **23**, 169 (1939).
19. O. E., Vyazov, B. V. Konykhov, R. F. Averkina, I. I. Titova, Folia biologica, **4**, 1 (1958).
20. O. E. Vyazov, A. I. Murashova, Folia microbiol., **7**, 98 (1962).
21. N. N. Jukov-Verejnikov, Usp. sovr. biol., **17**, 235 (1959).
22. G. Setterfield, J. M. Neelin, E. M. Neelin, S. T. Bayley, J. mol. Biol., **2**, 416 (1960).
23. V. Gheție, St. cerc. biochim., **2**, 293 (1959).
24. Y. Tazawa, T. Hirokawa, Plant Cell Physiol. (Tokyo), **4**, 95 (1963).
25. S. G. Wildman, C. C. Cheo, J. Bonner, J. biol. Chem., **180**, 985 (1949).
26. S. J. Singer, L. Eggman, S. G. Wildman, J. biol. Chem., **197**. 233 (1952).
27. J. W. Lyttleton, P. O. P. Ts'O, Arch. Biochem. Biophys., **73**, 120 (1958).
28. M. Zucker, H. T. Stinson, Arch. Biochem. Biophys., **96**, 657 (1962).
29. S. S. Melik-Sarkisian, N. M. Sisakian, E. N. Svetailo, Biohimiia, **27**, 1047 (1962).
30. R. W. Dorner, A. Kahn, S. Wildman, Biochim. Biophys. Acta, **29**, 240 (1958).
31. D. W. Kupke, J. biol. Chem., **237**, 3287 (1962).
32. D. Racusen, M. Foote, J. Collins, Canad. J. Bot., **42**, 960 (1964).
33. D. C. Smith, J. A. Bassham, M. Kirh, Biochim. Biophys. Acta, **48**, 299 (1961).
34. U. Heber, Ber. Dtsch. Bot. Gesell., **76**, 58 (1962).
35. L. Knoblauch-Reiter, Phyton, **10**, 157 (1963).
36. N. M. Sisakian, I. I. Filippovici, E. N. Svetailo, K. A. Aliyev, Biochim. Biophys. Acta, Previews, 4, 8, BBA, 95160 (1965).
37. U. Heber, Nature, **195**, 91 (1962).
38. D. C. Smith, Biochim. Biophys. Acta, **48**, 285 (1961).
39. J. Bove, I. D. Raacke, Arch. Biochim. Biophys., **85**, 521 (1959).
40. U. Heber, Plants Arch. Wiss. Bot., **59**, 600 (1963).
41. C. J. Pollard, Fed. Proc., **22**, 258 (1963).
42. J. T. O. Kirk, Biochem. J., **88**, 45 P, (1963).
43. J. T. O. Kirk, Biochem. Biophys. Res. Commun., **14**, 393 (1964).
44. F. Scholtz, N. Stubbe, Naturwissenschaften, **49**, 211 (1962).
45. R. R. Morton, J. K. Raison, Nature, **200**, 429 (1963).
46. H. Mohr, Ann. Rev. Plant. Physiol., **13**, 465 (1962) .

47. H. Mohr, Ber. Dtsch. Bot. Gesell., **76**, 454, 1962 (1963).
48. S. A. Gordon, Biol. Abstr., **45**, 48117 (1964).
49. G. Brawerman, D.A. Hufnagel, E. Chargaff, Biochim. Biophys. Acta, **61**, 340 (1962).
50. G. Brawerman, Biochim. Biophys. Acta, **61**, 313 (1962).
51. R. H. Nieman, L. L. Poulsen, Plant Physiol., **37**, suppl. 23 (1962).
52. J. W. Lyttleton, Nature, **177**, 283 (1956).
53. M. J. C. Rhodes, E. W. Yemm, Nature, **200**, 1077 (1963).
54. T. E. Weier, Amer. J. Bot., **50**, 604 (1963).
55. S. Granick, *The chloroplasts : inheritance, structure and function*, în J. Brachet şi A. E. Mirsky, *The Cell*, Academic Press, New York — London, 1961, **III**, 490.
56. W. Henke, Ann. Rev. Plant. Physiol., **13**, 27 (1962).
57. N. M. Sisakian, S. S. Melik-Sarkisian, Fiziol. Rast., **10**, 17 (1963).
58. A. Bennon, M. Avron, Biochim. Biophys. Acta, **79**, 648 (1964).
59. Katon Sakae, Atsui Takamiya, Arch. Biochem. Biophys., **102**, 189 (1963).
60. O. Moritz, *Die Serologie der pflanzlichen Eiweisskörper*, în W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin – Göttingen—Heidelberg, 1958, **VIII**, 390.
61. J. W. Newton, Biochim. Biophys. Acta, **58**, 474 (1962).
62. J. W. Newton, J. biol. Chem., **237**, 3282 (1962).
63. S. C. Lewis, H. T. Erstein, J. A. Schiff, Plant Physiol., **37**, suppl., 38 (1962).
64. J. Bonner, *Plant biochemistry*, Academic Press, New York, 1950, 263.
65. B. Capon, L. Bogorad, Bot. Gaz., **124**, 128 (1962).
66. B. Capon, L. Bogorod, Bot. Gaz., **123**, 285 (1962).
67. Asahi Tadashi, Agr. Biol. Chem., **27**, 734 (1963).
68. A. Nisonoff, G. J. Thorbecke, Ann. Rev. Biochem., **33**, 355 (1964).
69. R. M. Smillie, G. Krotkov, Canad. J. Bot., **39**, 891 (1961).
70. R. W. Dorner, A. Kahn, S. G. Wildman, J. biol. Chem., **229**, 945 (1957).
71. Oota Yukito, Ann. Rev. Plant. Physiol., **15**, 17, (1964).
72. H. S. Mckee, *Protein metabolism in flowers*, în W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, **VIII**, 554.
73. H. Walter, Nature, **198**, 189 (1963).
74. N. M. Sisakian, S. S. Melik-Sarkisian, E. Bezinger, Biohimiia, **17**, 626 (1952).
75. J. Nitsan, Plant Physiol., **34**, 291 (1962).
76. M. Bryant, L. Fowden, Ann. Bot., **23**, 65 (1959).
77. A. C. Leopold, M. Kawase, Amer. J. Bot., **51**, 294 (1964).
78. O. N. Kulaeva, P. Vorobleva, Fiziol. Rast., **9**, 106 (1961).
79. J. H. Sacher, Life Sci., **11**, 866 (1963).
80. J. L. Key, J. C. Shannon, Plant, Physiol., **39**, 360 (1964).
81. B. Danerl, A. Laloray, Curr. Sci. (India), **32**, 470 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 10, 4, 369-380 (1967)

PROTEINĂ NATIVĂ — PROTEINĂ DENATURATĂ

M. KEREKES

577.23

Denaturarea este una din proprietăţile cele mai caracteristice ale proteinelor, fiind strîns legată de particularităţile structurale ale acestora. Studierea ei ne apropie deci de cunoaşterea mai profundă a arhitecturii fine a moleculelor proteice. De fapt, teoria denaturării este teoria generală a structurii proteinelor native şi denaturate.

Denaturarea se întîlneşte des şi în viaţa de toate zilele. Fierberea unui ou constituie un exemplu — pe cît de simplu, pe atît de instructiv — al acestui fenomen. Prepararea mîncărurilor din carne sau alte alimente, implicînd încălzirea şi, prin aceasta, denaturarea componenţilor proteici, are ca scop bine definit uşurarea digestiei lor. În cursul preparării unor vaccinuri şi anatoxine atenuarea sau „îmblînzirea" antigenelor respective se obţine tot cu ajutorul denaturării. O serie întreagă de teste de floculare şi precipitare, utilizate în laboratorul clinic, se bazează pe denaturarea proteinelor serice, modificate în urma procesului patologic.

Transformările care însoţesc denaturarea sînt cele mai evidente la proteinele globulare. Teoria modernă a denaturării la această categorie de proteine se datoreşte lui Wu [1]. Conform acesteia, denaturarea constă în deplierea, sub acţiunea diferiţilor agenţi denaturanţi, a lanţurilor polipeptidice care alcătuiesc molecula proteică [2]. Aceasta pare foarte simplu şi numeroase manuale se mulţumesc şi azi cu atîta. Este indiscutabilă valoarea didactică a unor asemenea scheme, care însă adesea par să confirme în mod nejustificat principiul „*natura semper simplex est*". Dar, aşa cum a precizat Willstätter [3], „Bei tieferem Eindringen in biologische Probleme, aber nicht nur in diese, bestätigt sich dieser Satz niemals" (Pătrunzînd mai adînc în problemele biologice, dar nu numai în acestea, această afirmaţie nu se adevereşte niciodată).

Întradevăr, denaturarea poate fi mai uşor constatată decît definită. Definiţia dată de Wu, conform căreia „denaturarea este modificarea substanţei proteice naturale, în cursul căreia aceasta devine insolubilă în solvenţi în care înainte a fost solubilă", a fost urmată de multe altele. Aceasta constituie o dovadă în sine că procesul nu este atît de simplu cum s-a crezut, tocmai din cauza naturii extrem de complexe a structurii proteinelor, încă insuficient cunoscută.

În ceea ce priveşte mecanismul denaturării, teoria „tot sau nimic", conform căreia o proteină nu poate să existe decît sub două forme, una nativă şi alta denaturată, trebuie considerată învechită, fiind părăsită chiar de adepţii ei ([4] — p. 814, [5]). Această teorie ar avea două concluzii logice : *a*) o proteină denaturată ar trebui să aibă aceleaşi proprietăţi, independent de modul denaturării ; *b*) modificările în urma denaturării ar trebui să întrevină simultan şi să evolueze paralel. În realitate însă, nici una din aceste condiţii nu este îndeplinită. În schimb, numeroase experienţe dovedesc că există diferite forme şi grade ale denaturării, potrivit naturii proteinei, agentului de denaturare şi condiţiilor în care s-a efectuat denaturarea.

Procesul de denaturare se prezintă în forma cea mai complexă la proteinele globulare, o urmare directă a caracteristicilor structurale ale acestora. În continuare, vom încerca trasarea unei imagini cît mai fidele şi demonstrative a denaturării la aceste proteine. Tema fiind însă prea vastă, pe lîngă scurta tratare a unor aspecte generale, vom încerca să prezentăm laturile cele mai interesante ale problemei nativităţii şi denaturării, care stau astăzi în centrul atenţiei cercetătorilor.

A. PROTEINA NATIVĂ

Sub denumirea de proteine globulare se înţelege azi, în primul rînd, nu o categorie morfologică, ci un complex de însuşiri, comun pentru cîteva proteine mai temeinic studiate, reprezentanţi caracteristici ai acestei grupe. După Linderstrøm-Lang (6) şi Bernal [7], în structura tridimensională a proteinelor globulare deosebim patru nivele de organizare.

Structura de ordinul unu (primară) este reprezentată prin resturile de aminoacizi aşezate într-o anumită secvenţă, legate între ele prin legături covalente, de tip peptidic. Acest lanţ polipeptidic formează structura de bază, scheletul (*backbone*) moleculei proteice. Structurile de ordinul doi, trei şi patru, care formează macrostructura moleculei proteice, apar ca rezultat al interacţiunilor existente între numeroasele elemente structurale ale moleculei proteice.

În ultimii ani se vorbeşte adeseori de configuraţia sau conformaţia moleculelor proteice. Interpretarea diferită a acestor termeni creează adesea confuzii. Termenul de conformaţie a fost introdus în 1954 de Lumry şi Eyring [8], Rg pentru caracterizarea aşezării spaţiale a lanţului polipeptidic. În acest sens întrebuinţează termenul şi Flory [9] şi Jirgensons [10]. Tanford [11] a definit configuraţia ca „părţile structurale ale moleculei proteice care nu sînt complet determinate de legăturile chimice primare". Wetlaufer [12] găsind nesatisfăcătoare clasificarea lui Linderstrøm-Lang, a introdus şi el noi termeni. În loc de structură primară, el vorbeşte de secvenţa aminoacidică a lanţului peptidic, iar structurile secundare şi terţiare le cuprinde sub denumirea de conformaţie de lanţ înţelegînd sub aceasta conformaţia lanţului peptidic cît şi pe cea a grupărilor laterale.

Deosebit de supărătoare este existenţa diferiţilor termeni cînd sînt întrebuinţaţi pentru caracterizarea unor transformări sau tranziţii. Unii autori înţeleg sub modificări de conformaţie schimbarea formei sau a dimensiunilor moleculare, pe cînd alţii tranziţia dintre molecula globulară ghem statistic, neglijînd faptul că în asemenea cazuri au loc modificări la cel puţin două nivele de organizare structurală. Wolf şi Briggs [13] consideră modificare de conformaţie orice modificare intervenită în structura moleculei proteice, cu condiţia ca aceasta să fie reversibilă.

În lucrarea de faţă, termenul de conformaţie este întrebuinţat în sensul definiţiei originale a lui Lumry şi Eyring, înţelegîndu-se prin el macrostructura moleculei proteice globulare, iar sub modificare de conformaţie orice modificare a macrostructurii, fie reversibilă, fie ireversibilă.

În ceea ce priveşte forma moleculelor proteinelor globulare, trebuie precizat că singurul criteriu după care o proteină se încadrează în această grupă este ca dimensiunile ei să fie de aceeaşi ordine de mărime în toate direcţiile spaţiului. Astfel, întîlnim forme destul de variate. Hemoglobina are o formă aproape sferică, molecula fiind deosebit de compactă. Molecula ribonucleazei se aseamănă cu un disc, cu un orificiu la mijloc. Chimotripsinogenul are molecula în formă de elipsoid de rotaţie, care poartă o scobitură.

Sub *proteină nativă* se înţelege în general o substanţă proteică omogenă, care a fost izolată dintr-o sursă naturală prin metode cît mai menajatoare, presupunînd că structura şi proprietăţile caracteristice ale proteinei nu au suferit modificări în cursul operaţiunilor pe care le implică prepararea. Astfel, criteriul nativităţii pare să fie precis definit. Aceasta nu este însă decît o aparenţă. Înainte de toate, definiţia conturează numai imprecis modul de preparare, care nu este însă de loc neglijabil. Se cunoaşte sensibilitatea proteinelor faţă de unele acţiuni, în aparenţă neînsemnate. Nu este deci indiferent dacă o anumită proteină a fost izolată într-un fel sau în altul. Pe lîngă aceasta, se constată diferenţe considerabile în privinţa sensibilităţii proteinelor. O metodă de preparare, care la o proteină trece ca inofensivă, poate fi prea drastică pentru alta. Faptul că unele preparate enzimatice comerciale diferă mult în privinţa activităţii se datoreşte tocmai acestei circumstanţe. Desigur, şi impurităţile afectează activitatea; ele pot fi însă îndepărtate. În schimb, dacă o enzimă sau altă proteină se denaturează în cursul izolării, urmările sînt mai evidente. Aşa, de exemplu, albumina plasmatică formează foarte uşor agregate, motiv pentru care greutatea ei moleculară nu poate fi determinată cu o precizie mai mare de ± 2000.

Loeb și Scheraga [14] au găsit valoarea de 67 000 pentru greutatea moleculară a monomerului care constituie cea mai mare parte a albuminei, față de greutatea moleculară de 69 200 a preparatului lor.

În cazul măsurătorilor efectuate cu ajutorul difracției luminii, devierile care se datoresc agregării sînt și mai însemnate. Halwer și colab. [15] găsesc valoarea de 73 000, iar Edsall și colab. [16] 77 000 pentru greutatea moleculară a albuminei plasmatice bovine. Aceste discrepanțe serioase, pe lîngă diferențele care pot fi puse pe seama metodelor, se datorează în bună parte și naturii diferite a preparatelor întrebuințate, eventual și microeterogenității [17], [18].

Este firesc că nici una dintre metodele de preparare întrebuințate nu este atît de drastică încît să afecteze structura primară ; modificările pot să atingă deci numai macrostructura. În această privință, o anumită proteină considerată nativă, preparată prin diferite metode, este într-adevăr o individualitate chimică. Se pune, însă, întrebarea dacă și macrostructura diferitelor preparate poate fi considerată ca identică ? Cu aceasta am ajuns la punctul cardinal al problemei proteinelor native. Trebuie precizat că în prezent nu dispunem de procedee cu ajutorul cărora să putem detecta în mod sigur modificările fine ale macrostructurii proteinelor. Pentru acest motiv, la proteinele cu acțiune enzimatică sau hormonală, se consideră adesea drept criteriu principal al nativității activitatea biologică, însușirea cea mai caracteristică și care poate fi ușor măsurată.

Fără îndoială, această soluție este comodă, dar poate constitui sursa unor erori. În primul rînd, nu fiecare proteină posedă activitate enzimatică, deși s-au emis asemenea păreri, și nu lipsite de temei. În al doilea rînd, există multe dovezi că activitatea biologică nu este totdeauna strîns legată de conformația moleculei. Tripsina și alte enzime proteolitice își păstrează activitatea enzimatică în soluții concentrate de uree, cu toate că suferă cu siguranță modificări de conformație, după cum reiese din schimbarea unor parametri. Constatări asemănătoare s-au făcut și în cazul altor enzime.

Mult mai rezistentă decît proteinazele este ribonucleaza (RN-aza), care își păstrează activitatea și în soluții de uree 8 M [19], cu toate că în aceste condiții molecula este complet depliată. După unele date, RN-aza nu numai că își păstrează activitatea în prezența ureei 8 M, dar aceasta crește chiar la aproximativ dublul valorii native [20]. Or, macrostructura RN-azei fiind modificată, prin definiție ea trebuie considerată denaturată. Dacă se consideră deci activitatea enzimatică ca principalul criteriu al nativității, ne aflăm în fața situației că o enzimă denaturată este mai activă — deci mai nativă — decît cea nativă, ceea ce este o absurditate. Este, desigur, o altă problemă de ce în natură nu există formele cele mai active posibile ale enzimelor. Probabil că, în general, proteinele nu sînt mai bune decît trebuie să fie, pentru funcțiile specifice pe care le îndeplinesc.

Este caracteristică în această privință comportarea unor enzime extrase din alge și bacterii termofile. Proteaza din *Bacillus thermoproteolyticus* își păstrează complet activitatea după o încălzire de mai multe ore la 80°C [21]. Enzima este rezistentă și față de acțiunea ureei și a detergenților, despre care se știe că inhibă complet majoritatea enzimelor [22]. Problema dacă această stabilitate s-ar datora faptului că enzima se află sub formă de ghem statistic deja în stare nativă, sau unor particularități structurale, a fost rezolvată în favoarea ultimei presupuneri [23].

Și mai frapante decît cele enumerate sînt rezultatele privitoare la urmările unor modificări ale structurii primare, asupra activității enzimatice. Astfel, îndepărtarea valinei C-terminale sau chiar a trei aminoacizi C-terminali (Val. Ser. Ala.) nu duce la inactivarea RN-azei [24]. Subtilizina hidrolizează RN-aza între aminoacizii 20 și 21, fără să survină pierderea activității [25]. Fragmentul denumit „peptida S", care constă din 20 de aminoacizi, poate fi separat de „proteina S" macromoleculară, prin fracționare cu acid tricloracetic. Este suficient însă ca cele două fragmente să fie amestecate în proporții echimoleculare pentru ca întreaga activitate să reapară. Fără îndoială, o asemenea proteină diferă mult de forma sub care ea se află în celula vie.

Exemplele înşirate, mai ales ultimele, dovedesc cît de puţin sigur criteriu al nativităţii este activitatea biologică, cu atît mai mult cu cît multe proteine nici nu o posedă. În fond, persistenţa activităţii biologice nu înseamnă decît că acele părţi ale moleculei de care este legată activitatea nu suferă modificări (esenţiale) în cursul acţiunilor cărora le-a fost supusă proteina. În acelaşi timp însă, nu pot fi neglijate modificările conformaţionale sau chiar ale structurii primare, pe care ea le-a suferit.

Ar trebui deci să se caute un criteriu mai sigur al nativităţii. Cel mai logic ar fi ca aceasta să se bazeze pe structura moleculei. Chiar de la început trebuie să constatăm însă că, în stadiul actual al ştiinţei, numai structura primară, secvenţa aminoacidică poate fi determinată cu precizie suficientă. Se pune chiar întrebarea dacă este principal posibilă determinarea exactă a macrostructurii. Există o întreagă serie de dovezi care pledează petru extraordinara plasticitate sau, cu altă expresie, flexibilitate a moleculei proteice. Modificarea pH-ului şi a forţei ionice între anumite limite are ca urmare modificarea considerabilă a conformaţiei şi, în consecinţă, a proprietăţilor proteinelor, care în mod practic însă sînt complet reversibile [26].

O altă însuşire caracteristică a albuminei plasmatice este tranziţia N—F, care în esenţă poate fi considerată o izomerizare. Luetscher [27] a observat primul că şi cele mai pure preparate de albumină sînt eterogene din punct de vedere electroforetic, în jur de pH 4. După cercetările minuţioase ale lui Aoki şi Foster [28], efectuînd electroforeza la 0°C şi la un pH cuprins între 3,5 şi 4,5, se observă două fracţiuni, a căror cantitate este în funcţie de pH. Forma normală, stabilă peste pH 4,5, a fost denumită forma N, iar cealaltă, care în aceste experienţe a manifestat o mobilitate mai mare, s-a denumit forma F (*fast*). Transformarea poate fi reprezentată prin ecuaţia

$$N + 3\,H^{+} \rightleftarrows F$$

şi este complet reversibilă. Tranziţia are loc în timp de cîteva minute, dacă pH-ul se coboară sub 4.

Unele aspecte ale flexibilităţii moleculare proteice pot fi satisfăcătoare pe baza teoriei adaptabilităţii configuraţionale a lui Karush [29]. Conform acesteia, unele regiuni ale moleculei proteice pot exista sub numeroase configuraţii, care se află în echilibru termodinamic şi al căror conţinut de energie este practic identic. Astfel, de exemplu, în prezenţa unui colorant organic se stabilizează acea configuraţie care corespunde în cel mai înalt grad substanţei cu care proteina se combină. De altfel, interacţiunea dintre enzime şi diferite molecule mai mici are un rol deosebit în inhibarea, respectiv activarea alosterică a enzimelor. Bineînţeles, măsura adaptabilităţii proteinelor este diferită. Iată o dualitate în natura moleculelor proteice : în anumite condiţii ele se comportă ca structuri rigide, stabile, care totuşi posedă o flexibilitate considerabilă ; cu alte cuvinte, molecula proteică este capabilă să-şi modifice structura în mod reversibil, sub influenţa anumitor acţiuni. Chiar pe baza acestor considerente, se înţelege că o proteină aflată în mediul ei natural şi cea îndepărtată din acesta nu pot fi identice.

Se presupune că unele enzime care nu posedă proprietăţi alosterice şi le-au pierdut pe acestea tocmai în urma izolării. După cum am văzut, starea actuală a proteinei este determinată de mediul acesteia. În celula vie, proteinele se află în interacţiuni intime cu o întreagă serie de substanţe. Este imposibilă realizarea unui asemenea sistem, *in vitro* ; aceasta ar însemna sintetizarea celulei vii. Pe lîngă aceasta, proteina participă la toate modificările intervenite în starea celulei. Poate fi deci enunţat că, în privinţa stării, proteina nativă *in vitro* nu poate fi identică niciodată cu proteina nativă *in vivo*, care formează o componentă a materiei vii, în sensul formulării lui Macovschi [30]. Diferenţa între formele native *in vivo* şi cele *in vitro* ale aceleiaşi proteine nu trebuie însă să depăşească în mod obligatoriu limitele flexibilităţii. Dacă reuşim deci ca, prin metode potrivite, să izolăm o proteină fără ca macrostructura ei să sufere modificări ireversibile, atunci am obţinut preparatul cel mai nativ posibil, *in vitro*. Greutatea constă desigur tocmai în aprecierea faptului, dacă acţiunile cărora proteina le-a fost supusă au determinat

modificări într-adevăr plastice, sau dacă au intervenit modificări ireversibile ale macrostructurii sale. Posibilitatea modificării conformației în cursul izolării este cu atît mai probabilă, cu cît molecula proteică este mai mare și mai complexă.

Situația nu trebuie totuși privită prea pesimist. Chiar dacă nu avem dovezi directe pentru a decide dacă conformația unui preparat proteic este identică cu cea *in vivo*, putem fi siguri că acțiunea lui specifică este aceeași, diferențele fiind doar de ordin cantitativ. Deosebit de favorabil pot fi apreciate cazurile în care diferitele metode de preparare au ca rezultat același produs. Aceasta pledează în sine pentru concluzia că macrostructura n-a suferit modificări de loc, sau numai în mică măsură. Cu toate acestea, azi nu se poate afirma cu siguranță, despre nici o proteină, dacă este absolut nemodificată față de forma în care s-a aflat în sursa ei naturală.

În cazul enzimelor, în lipsa unor criterii mai potrivite, sînt considerate „mai native" preparatele cu activitate mai mare. Se poate deci întîmpla ca în viitor să se prepare forme și mai active, deci mai „native" decît cele existente azi.

„Proteina nativă" nu este deci decît o noțiune convențională, care denotă că proteina respectivă nu diferă prea mult de cea originală, în privința structurii și a proprietăților sale fizice, chimice și funcționale.

B. PROTEINA DENATURATĂ

Pentru pionierii biochimiei, denaturarea a apărut ca un fenomen nedorit în cursul studierii proteinelor. O dată recunoscută însă, ea a devenit subiectul unor studii aprofundate [31], [32]. Denumirea însăși pare să indice în mod precis conținutul noțiunii de denaturare. Sub acțiunea celor mai variați agenți fizici și chimici, proteina nativă își pierde însușirile ei originale, se denaturează. La începuturile chimiei proteinelor, proprietatea cea mai caracteristică a unei proteine s-a considerat solubilitatea ei. Cum fenomenul comun și cel mai izbitor care însoțește denaturarea proteinelor aflate în soluție este coagularea lor, nu este de mirare că la început denaturarea s-a definit ca pierderea solubilității proteinelor. În retrospectivă, Steinhardt și Zaiser [33] au cuprins toate aceste definiții sub formula : „în sensul banal, denaturarea este pierderea virtual completă a solubilității proteinelor în soluții saline, la punctul izoelectric". Bineînțeles, asemenea definiții, astăzi perimate, sînt pur formale și nu cuprind decît un singur aspect al unui proces care, în realitate, s-a dovedit a fi cu mult mai complex decît s-a crezut la început. Cu dezvoltarea metodelor întrebuințate pentru studierea proteinelor, s-a constatat că în cursul denaturării proteinele își modifică nu numai solubilitatea, ci și o întreagă gamă de alte însușiri. Erori grosolane, ca, de exemplu, susținerea existenței unei hidrolize parțiale a legăturilor peptidice în cursul denaturării, au fost repede eliminate.

După investigațiile fundamentale ale lui Kunitz și Northrop [34], Mirsky și Anson [35], precum și ale colectivului condus de Neurath [36], s-a recunoscut rolul decisiv al macrostructurii proteinelor în procesul de denaturare. Astfel s-a ajuns la interpretarea corectă a fenomenului, formulată de Neurath [36] în felul următor : „denaturarea este orice modificare neproteolitică a structurii unice a proteinei native, în urma căreia se produc anumite schimbări în proprietățile sale chimice, fizice și biologice". În loc de „neproteolitic" este mai potrivit să se întrebuințeze termenul de nehidrolitic, întrucît orice hidroliză a legăturilor peptidice se exclude. Putnam, unul dintre cei mai cunoscuți specialiști în materie, a definit denaturarea ca „rearanjarea fizică sau intramoleculară a structurii proteinei native, care duce la modificarea configurației spațiale specifice, fără hidroliza legăturilor covalente primare" ([4], p. 809). Este inutilă enumerarea tuturor definițiilor existente, care de fapt constituie diferite variații ale celor de mai sus și care. toate, pot fi reduse la formularea cea mai concisă, anume că denaturarea este modificarea macrostructurii proteinelor. Desigur, această definiție este destul de largă. Este însă greu să se ajungă la una mai precisă, date fiind lacunele existente în cunoștințele noastre privitoare la macrostructură.

În cele mai multe cazuri, macrostructura nativă nu poate fi cunoscută decît prin distrugerea ei. În acest sens, studiul denaturării are un caracter mai mult calitativ şi descriptiv decît cantitativ şi analitic, însă a furnizat rezultate remarcabile în însăşi dezvoltarea concepţiei despre macrostructură. De la început trebuie precizat că, în ciuda unor trăsături comune ale mecanismului denaturării, proteinele prezintă multe particularităţi individuale în comportamentul lor faţă de diferiţi agenţi denaturanţi, care şi ei acţionează în feluri diferite. În general, denaturarea se studiază în soluţii apoase de proteine, în prezenţa unor ioni anorganici (tampoane) şi la un anumit pH. Forţa ionică pH-ul şi temperatura soluţiilor proteice constitue deci factori permanenţi, care nu pot fi excluşi şi care sînt interdependenţi.

1. Unele proprietăţi ale proteinelor denaturate

Pe lîngă scăderea solubilităţii, una din cele mai caracteristice urmări ale denaturării este modificarea proprietăţilor hidrodinamice ale proteinelor, majoritatea agenţilor denaturanţi provocînd creşterea considerabilă a viscozităţii specifice. Concomitent cresc şi raportul de fricţiune şi birefringenţa de scurgere, şi scade constanta de difuziune. Toate acestea se datoresc creşterii asimetriei moleculare, care se produce prin deplierea lanţurilor polipeptidice. Elongarea moleculelor proteice în urma denaturării nu este foarte mare ; de exemplu, în cazul albuminei serice gradul elongării maxime nu depăşeşte 4. La proteine în general nu se produc niciodată bastoane rigide, cum este cazul, de exemplu la unele polipeptide monotone sintetice. Ghemul statistic se caracterizează tocmai printr-o flexibilitate considerabilă. Totuşi, şi acesta poate să aibă o formă preferenţială, datorită legăturilor disulfidice, care nu sînt desfăcute de agenţii denaturaţi şi limitează numărul configuraţiilor posibile.

Foarte frecvent se întîlneşte şi agregarea, mai ales în cazul denaturării prin căldură. La albumina serică de bou, Segal [37] a găsit formarea unui tetramer, după încălzire la 70°C.

Denaturarea modifică şi proprietăţile electrochimice ale proteinelor, printre care comportarea electroforetică. După încălzire, mobilitatea electroforetică a albuminei serice umane scade [37], iar cea a *gamma*-globulinelor creşte [38]. În cazul încălzirii serului integral, aceste transformări se manifestă în omogenizarea fracţiunilor. Procesul începe să se manifeste în jurul temperaturii de 62°C [39], prin apariţia unei fracţiuni cu mobilitate medie, şi devin ecomplet peste 70°C, cînd practic nu mai există decît o singură fracţiune.

În ultimul timp, o importanţă deosebită a dobîndit studierea variaţiei activităţii optice a proteinelor denaturate, care constă în creşterea levorotaţiei. Rotaţia optică a proteinelor este mai scăzută decît valoarea care ar fi de aşteptat pe baza aminoacizilor componenţi. Valori care se apropie de cea teoretică nu pot fi obţinute decît în cazul proteinelor denaturate. Pe baza acestei observaţii şi a unor considerente teoretice, s-a ajuns la concluzia că proprietăţile optice ale proteinelor depind de prezenţa structurilor spiralate. În acest caz, creşterea levorotaţiei în urma denaturării ar indica desfacerea spiralelor alfa. Este însă foarte probabil că şi interacţiunile dintre catenele laterale apolare, precum cele dintre catenele laterale şi scheletul polipeptidic contribuie la valoarea rotaţiei specifice. Trebuie deci reconsiderată concepţia conform căreia modificările rotaţiei optice în cursul denaturării s-ar datora exclusiv tranziţiilor de tip elice → ghem statistic. Oricum însă, rotaţia optică şi, în special, dispersia rotaţiei rămîn indicatoare preţioase ale transformărilor structurale.

Un alt fenomen care caracterizează proteinele denaturate este comportarea unor grupări reactive care, deşi existente în molecula nativă, nu reacţionează cu reactivii specifici decît după denaturare. Aceste grupări au fost denumite „mascate". Mascarea se datoreşte în primul rînd factorilor sterici, adică plierii lanţului polipeptidic, dar poate avea şi alte cauze, ca participarea la legături de diferite naturi. În afară de grupările tiolice, pot fi mascate şi alte grupări, ca cele disulfidice, fenolice, indolice, precum şi cele carboxilice şi aminice [40].

Glazer şi McKenzie [41] au constatat că coloraţia maximă cu reactivul Folin-Ciocâlteu apare la serumalbumină în prezenţa ureei 3 M, practic instantaneu, iar la ovalbumină numai la 6 M şi peste 30 min. Fenomenul poate fi observat şi în cazul tripsinei, efectul cel mai pronunţat avînd încălzirea, în timp ce dodecilsulfatul de sodiu provoacă chiar o uşoară scădere a intensităţii reacţiei [42].

Din păcate, nu posedăm metode specifice pentru punerea în evidenţă a catenelor laterale apolare ; se poate presupune însă că şi acestea se pot afla în stare mascată.

Despre scăderea sau pierderea activităţii enzimelor în cursul denaturării s-a relatat în legătură cu problema nativităţii.

Denaturarea modifică şi proprietăţile imunologice ale proteinelor. În general, se poate constata scăderea antigenicităţii, modificîndu-se şi specificitatea.

Sub acţiunea denaturării, la majoritatea proteinelor creşte susceptibilitatea faţă de acţiunea proteazelor, ceea ce constituie în sine o dovadă a apariţiei unor grupări peptidice mascate, inaccesibile enzimei în proteina nativă. Fenomenul este deosebit de pregnant la albumina serică, care în stare nativă nu este hidrolizată de tripsină decît foarte încet. Încălzind albumina serică, sensibilitatea maximă faţă de tripsină este atinsă practic instantaneu [43]. Cu ajutorul acestei metode s-a reuşit punerea în evidenţă a unui mare număr de forme intermediare, care apar în cursul denaturării. Studiindu-se variaţia sensibilităţii faţă de tripsină a albuminei serice, într-un interval mai larg de temperatură, s-a reuşit obţinerea unor date referitoare la succesiunea desfacerii legăturilor care menţin macrostructura albuminei [44].

În afară de cele enumerate, sînt modificate în cursul denaturării şi alte proprietăţi ale proteinelor, ca de exemplu puterea de fixare a unor coloranţi. Dacă denaturarea se face în prezenţa colorantului, cantitatea fixată este cu mult mai mare decît în cazul cînd colorantul s-a adăugat ulterior [45]. Fenomenul se explică prin interacţiunea colorantului cu grupările active, chiar în momentul eliberării acestora, pe cînd în absenţa colorantului grupările reacţionează între ele.

2. Protecţia faţă de denaturare

O posibilitate de evitare a denaturării proteinelor constă în alegerea unor condiţii de lucru cît mai blînde : temperatură joasă, evitarea variaţiilor prea largi de pH şi de forţă ionică, deshidratarea efectuată la presiune şi temperatură scăzută. Ca exemplificare poate servi metoda lui E.J. Cohn pentru izolarea şi purificarea proteinelor plasmatice. Deshidratarea completă conferă proteinelor o stabilitate importantă : plasma liofilizată se conservă timp de mai mulţi ani, la temperatura camerei.

O altă posibilitate de prevenire a denaturării constă în adăugarea la soluţiile proteice a unor substanţe cu acţiune protectoare. Asemenea substanţe pot să aparţină unor categorii foarte variate. Astfel s-a reuşit evitarea coagulării recurgîndu-se la prezenţa acizilor graşi, care după părerea unor autori trebuie să conţină cel puţin 7 atomi de carbon pentru a fi eficace. Caprilatul nu numai că previne coagularea, dar şi stabilizează într-o anumită măsură proteinele [46].

Glucidele manifestă şi ele o acţiune protectoare, constatîndu-se diferenţe în privinţa eficacităţii. Dintre monozaharide, cea mai activă este galactoza [47]. În afară de coagulare, glucidele previn formarea fracţiunii electroforetice cu mobilitate medie în serul sanguin, precum şi inactivarea tripsinei [48]. Fenomenul se bazează pe izolarea moleculelor proteice, îngreuindu-se mai ales agregarea acestora. Se pare însă că glucidele sînt în stare să provoace şi unele modificări ale macrostructurii, considerate de Clément-Métral şi colab. [49] ca transformări alosterice care ar putea avea ca urmare stabilizarea macrostructurii.

3. Tranziții moleculare în cursul denaturării

Transformarea cea mai caracteristică pentru denaturare se consideră în general tranziția spirală → ghem statistic. Modificarea activității optice vine să susțină această părere, precum faptul că energia internă a formei spiralate este maximă, cea a ghemului statistic minimă. Bineînțeles, nu trebuie trecut cu vederea că raportul structurilor spiralate din diferitele proteine față de cele amorfe este destul de redus, în cazul fibrinogenului fiind de 33% [50].

Desfacerea spiralelor presupune ruperea legăturilor de H care le stabilizează. Sub acțiunea diferiților agenți, această rupere se instalează simultan la un mare număr de legături, eventual după principiul „fermoar" (*unzippering*). Aceasta provoacă modificarea bruscă a macrostructurii, fapt care a determinat pe unii autori să considere denaturarea ca o „tranziție de fază din starea cristalină în una amorfă" [51]. Analogia dintre structurile spiralate și starea cristalină este justificată prin existența unor elemente structurale organizate, care se repetă periodic, și chiar prin desfacerea bruscă a acestora într-un anumit interval de temperatură, relativ restrîns. Dezorganizarea structurilor spiralate prezintă oarecare analogie cu topirea. O anumită proteină poate să prezinte și mai multe asemenea „temperaturi de topire", în funcție de condițiile în care se execută denaturarea. În special pH-ul are un puternic efect asupra temperaturii de tranziție, cum mai este denumită această caracteristică [51]. În mod obișnuit, tranziția se urmărește prin măsurarea rotației optice. Este interesant că în jurul unui pH neutru, curbele rotației optice și cele care reflectă modificarea sensibilității față de tripsină au un aspect aproape identic [43]. Astfel, primul mare salt în digestibilitatea proteinelor globulare coincide cu tranziția de fază și este o urmare a acesteia.

Analogia cu topirea nu trebuie însă împinsă prea departe. După cum am văzut, tranziția de fază se reflectă în puține proprietăți ; pînă în prezent, numai cîteva proteine au fost studiate în acest sens. În afară de aceasta, reprezentarea desfacerii moleculei globulare în cursul denaturării ca o tranziție spirală → ghem statistic este mult prea simplificată, neglijînd celelalte forțe care contribuie la menținerea macrostructurii. Adăugarea de solvenți organici la soluții proteice acționează asupra zonelor hidrofobe ale moleculelor. În asemenea condiții, polipeptidele sintetice monotone pot să-și asume în întregime o structură spiralată. Întrebuințînd solvenți cu caracter puternic apolar (cloroform, dioxan), proporția structurilor spiralate crește și la unele proteine [52]. După cercetările lui Elődi [53], în prezența dimetilformamidei crește nu numai spiralizarea RN-azei, dar și activitatea enzimatică a acesteia.

Acceptînd că punctul de atac al ureei îl reprezintă legăturile de H, în anumite condiți poate avea loc despiralizarea lanțului polipeptidic, cu menținerea însă a unor alte legături int erne Deci, în funcție de condițiile denaturării, modificările structurale se pot desfășura în mod diferit [54].

Desigur, acest aspect este întrucîtva idealizat, deoarece desfacerea strict electivă a unor tipuri de legături este greu de realizat în practică. Între diferitele tipuri de legături există interacțiuni cooperative și, adesea, desfacerea uneia atrage după sine și slăbirea celorlalte, dacă nu chiar destrămarea întregii macrostructuri. În afară de aceasta, prin eliberarea unor grupări reactive mascate, transformările strict intramoleculare sînt rapid complicate și de procese intermoleculare. Poate că cea mai mare semnificație în această privință revine grupărilor —SH. O dată eliberate, acestea reacționează între ele, regrupîndu-se. Huggins și colab. [55] au observat cei dintîi că compușii tiolici accelerează deja la o concentrație redusă coagularea termică a albuminei plasmatice și al altor proteine, pe cînd reactivii care blochează grupările sulfhidrilice inhibă coagularea. Rezultate similare s-au observat și în denaturarea cu uree sau guanidină. În uree concentrată, Hospelhorn și colab. [56] au observat două faze ale reacției, anume o creștere rapidă a viscozității, urmată de creșterea mai prelungită a acesteia. În special această a doua fază a fost foarte sensibilă la reactivi sulfhidrilici. Fenomenul a fost interpretat ca un tip

special de reacţie în lanţ, constînd într-un schimb între grupările —SH şi —S—S—, care poate fi reprezentat astfel :

$$R-SH + \begin{matrix} S \\ | \\ S \end{matrix} \!\!\rangle R' \rightarrow R-S-S-R'-SH$$

O legătură intramoleculară disulfidică este astfel înlocuită printr-o legătură intermoleculară. Noua grupare —SH este capabilă să intre în reacţie în continuare, cu formarea unei structuri tridimensionale, avînd ca urmare gelificarea sau precipitarea proteinei. Grupările —SH joacă deci un rol catalitic, o cantitate mică fiind în stare să declanşeze reacţia. Prelungirea în timp a reacţiilor de acest tip este uşor de înţeles dacă ne gîndim la faptul că ele presupun coliziuni efective între moleculele proteice. Reacţia, denumită schimb disulfidic, deţine un rol important în denaturare şi este în mare măsură responsabilă de ireversibilitatea proceselor [57]. În special, albumina plasmatică, a cărei moleculă conţine 17 grupări disulfidice şi o grupare —SH liberă, înclină spre schimbul disulfidic. Este clar că asemenea reacţii complică interpretarea procesului de denaturare şi ele ar trebui prevenite pentru a putea urmări modificările primare.

Este foarte probabil că schimbul disulfidic nu reprezintă singurul tip de reacţie care are loc după tranziţia intramoleculară propriu-zisă şi care trebuie considerat ca prima fază a denaturării. Faza secundară nu trebuie să se limiteze însă numai la reacţii intermoleculare. Pot reacţiona între ele şi grupările aparţinînd aceluiaşi lanţ polipeptidic, mai ales dacă acesta este suficient de lung ca unele segmente să se apropie la distanţe oportune.

Multe date pledează pentru ideea că, în general, prima fază a denaturării decurge foarte repede. Astfel, Kauzmann şi colab. [58] au observat că creşterea levorotaţiei şi a viscozităţii sub acţiunea ureei se instalează instantaneu, la albumina de plasmă de bou. După observaţiilei noastre [43], creşterea sensibilităţii faţă de tripsină se instalează şi ea practic imediat. Variaţiile ulterioare, care decurg mai lent, se datoresc reacţiilor secundare [59]. În cazul denaturării cu guanidină, acestea se prelungesc pînă la 24 de ore. În concluzie se poate preciza că prima fază a denaturării este o reacţie prin excelenţă intramoleculară, care are loc practic instantaneu şi constă în determinarea macrostructurii sau a unor elemente ale acesteia. Faza a doua, mai prelungită, cuprinde atît reacţii intra- cît şi intermoleculare, dintre care cea mai importantă este schimbul disulfidic.

4. Reversibilitatea proceselor de denaturare

Suspendarea acţiunii denaturante nu înseamnă şi încetarea transformărilor proteinei implicate. Astfel, după răcirea soluţiilor de ovalbumină supuse în prealabil termodenaturării, viscozitatea creşte încă timp de mai multe ore. De fapt, chiar încetarea acţiunii denaturante (răcire, îndepărtarea ureei prin dializă, neutralizare) provoacă unele modificări, care decurg în două direcţii. Există pe de o parte tendinţa de refacere a structurii originale, care în majoritatea cazurilor constă în restaurarea parţială a structurilor spiralate şi a celorlalte interacţiuni. Pe de altă parte, continuă reacţiile intermoleculare, avînd ca urmare formarea unor agregate. Dat fiind numărul mare al posibilităţilor de recombinare, poate fi întrevăzută formarea mai multor variante atît de molecule izolate, cît şi de agregate [60]. În cazul moleculelor neasociate, variantele ar diferi între ele în privinţa macrostructurii, iar la agregate, după numărul moleculelor componente. Pînă în prezent, punerea în evidenţă a particulelor diferite s-a rezolvat în special prin demonstrarea unei eterogenităţi a greutăţii particulelor. Punerea în evidenţă a „microeterogenităţii structurale", cum ar putea fi denumită existenţa moleculelor cu macrostructură diferită, este o problemă dificilă, care deocamdată se pare că n-a fost rezolvată decît într-un singur caz. Studiind RN-aza denaturată, Brown şi colab. [6] au reuşit să separe cu ajutorul analizei cromatografice pe IRC—50, la pH 6,18, două fracţii majore şi cinci minore, inactive, dintre care nici una n-a fost identică cu RN-aza A, fiind lipsite şi de activitate imunologică.

Dacă denaturarea se efectuează în astfel de condiţii încît reacţiile intermoleculare, care prin natura lor sînt ireversibile, să fie excluse, atunci în principiu, există posibilitatea de refacere a structurii originale, după îndepărtarea agentului denaturant.

În literatura de specialitate s-a vorbit mult despre problema reversibilităţii. Subiectul a fost studiat în special de şcoala lui Neurath [62], pe albuminà serică, folosind ca agent denaturant ureea. Îndepărtînd-o pe aceasta prin dializă, se obţin două fracţiuni, una solubilă, denumită „regenerată", iar alta insolubilă, denumită „ireversibil denaturată". Dat fiind că unii parametri ai proteinei „regenerate" au fost apropiaţi de cei ai proteinei native, s-a considerat că denaturarea cu uree este reversibilă, cel puţin pentru o anumită parte a proteinei. În realitate, lucrurile pot fi privite astfel numai cu multă bunăvoinţă. Chiar dintre parametrii studiaţi, numai cristalizabilitatea şi solubilitatea la punctul izoelectric s-au dovedit a fi identice cu cele ale proteinei native, în timp ce în privinţa viscozităţii, difuziunii, greutăţii moleculare, a sensibilităţii faţă de enzime proteolitice şi în special a activităţii antigenice, proteina „regenerată" s-a deosebit net de cea nativă. Or, dacă produsul denaturării diferă chiar numai în privinţa unei singure proprietăţi de proteină nativă, aceasta înseamnă că denaturarea a fost ireversibilă.

Azi, cînd posibilităţile de studiere a proteinelor sînt din ce în ce mai numeroase, trebuie să constatăm că în foarte puţine cazuri se poate vorbi despre o renaturare adevărată. Într-adevăr procese complet reversibile se întîlnesc numai în cazul unor intervenţii relativ slabe, la temperaturi nu prea ridicate (sub 50°C) sau la concentraţii scăzute de uree. Aceasta dovedeşte că numai stadiile iniţiale ale denaturării sînt reversibile. Este de la sine înţeles că, în aceste cazuri, macrostructura suferă modificări de aşa natură încît după încetarea acţiunii denaturante configuraţia originală să poată fi restabilită. Dacă modificările sînt mai profunde, denaturarea devine reversibilă.

Rezistenţa mai accentuată faţă de denaturare, respectiv tendinţa de renaturare, sînt legate de unele elemente structurale ale moleculei proteice. Azi se crede că macrostructura este în mare măsură determinată de secvenţa aminoacidică ; în consecinţă, ghemul haotic format sub acţiunile denaturante tinde să-şi redobîndească forma originală după încetarea acestora. Este însă uşor de înţeles că şansele refacerii fidele a arhitecturii moleculare originale sînt cu atît mai scăzute cu cît molecula este mai mare.

Un element important în determinarea stabilităţii moleculelor faţă de agenţii denaturanţi şi a înclinaţiei lor de a se reface îl formează legăturile disulfidice. Exemplul cel mai elocvent îl reprezintă RN-aza, o moleculă relativ mică, în care lanţul polipeptidic este sudat de patru legături disulfidice. Într-adevăr, RN-aza este una din proteinele cele mai rezistente la acţiuni denaturante. Ne putem face o idee despre posibilităţile sale de revenire la forma originală, pe baza comportării RN-azei faţă de reducere. O reducere uşoară duce la pierderea completă a activităţii enzimatice. După reoxidare, enzima devine iarăşi activă, într-o proporţie de 80% [63]. Fenomenul este frapant, deoarece deşi există 105 posibilităţi de recombinare a celor 8 grupări —SH eliberate, totuşi se realizează în cea mai mare parte reconstituirea structurii originale. Un fenomen asemănător se observă şi în cazul cobrotoxinei [64]. Este interesant de amintit că, după Fuchs şi colab. [65], în toate celulele ar exista o enzimă (*disulfide interchange enzyme*) în stare să transforme legăturile disulfidice incorect formate în legături care corespund formei native.

Cazul RN-azei reprezintă însă o excepţie. Faptul că renaturări veritabile se constată numai în condiţii de denaturare slabă pune la îndoială justeţea întrebuinţării acestor termeni. S-a mai vorbit despre marea plasticitate a moleculelor proteice. Chiar în soluţiile proteinelor native, nu toate moleculele se află într-o stare identică, ci într-un echilibru dinamic al unor stări extreme [29], [66], [67]. Modificări de pH, forţă ionică şi alte intervenţii, considerate ca inofensive, determină adesea schimbări considerabile ale proprietăţilor proteinelor, care însă, fiind complet reversibile, nu sînt considerate denaturări, cu toate că implică modificări ale macrostructurii. Trecerea acestor modificări plastice, care ar putea fi denumite „deformări",

în modificări ireversibile, deci în denaturare, este adesea ştearsă, fiind imposibil de stabilit graniţa dintre ele. În cazurile, deci, în care are loc în mod cert o renaturare absolută, termenul de „denaturare" se confundă cu cel de „deformare", şi astfel termenul de „denaturare reversibilă" îşi pierde complet sensul.

De fapt, singurul criteriu pe baza căruia denaturarea poate fi diferenţiată de deformare este starea în care proteina se află după suspendarea efectului denaturant. Dacă proteina diferă de cea nativă, s-a produs o denaturare, iar dacă nu, atunci n-a avut loc decît o deformare mai mult sau mai puţin accentuată. Termenul de *denaturare* este rezervat deci pentru indicarea proceselor ireversibile, cele reversibile fiind cuprinse sub termenul de *deformare*. Pe baza acestor considerente, *denaturarea este modificarea ireversibilă a macrostructurii proteinelor, după încetarea acţiunii care a provocat-o*. Astfel, termenul de denaturare îşi recîştigă literalmente semnificaţia. Criteriul de ireversibilitate este desigur relativ, el fiind determinat de posibilităţile actuale ale ştiinţei. Cu siguranţă că se vor găsi metode prin care modificări considerate azi ireversibile vor putea fi „reparate".

Academia Republicii Socialiste România
Baza de cercetări ştiinţifice Tîrgu-Mureş

Prezentat la redacţie la 28 decembrie 1966

BIBLIOGRAFIE

1. H. Wu, Chin. J. Physiol., **5**, 321 (1931).
2. F. Haurowitz, în *Chemistry and biology of proteins*, Ediţia în l. rusă, Moscova, 1953, p. 148.
3. C. Dhéré, Candollea, **10**, 23 (1943). Cit. : R.L.M. Synge, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. **1**, 1 (1962).
4. F.W. Putnam, *Protein denaturation*, în : H. Neurath, K. Bailey, *The proteins*, vol. I.B., Academic Press, New York, 1953.
5. M.L. Anson, Advances in protein chemistry, **2**, 361 (1945).
6. K.K. Linderstrom-Lang, *Proteins and enzymes*, Lane memorial lectures, Stanford University Press, 1952, p. 54.
7. J.D. Bernal, Discuss. Faraday Soc., **25**, 7 (1958).
8. R. Lumry, J. Eyring, J. Phys. Chem., **58**, 110 (1954).
9. P.J. Flory, J. Polymer Sci., **49**, 105 (1961).
10. B. Jirgensons J. Amer. Chem. Soc., **83**, 3161 (1961).
11. C. Tanford, J. Amer. Chem. Soc., **84**, 4240 (1962).
12. D.B. Wetlaufer, Nature, **190**, 1113 (1961).
13. W.J. Wolf, D.R. Briggs, Arch. Biochem. Biophys., **76**, 377 (1958).
14. G.I. Loeb, H.A. Scheraga, J. Phys. Chem., **60**, 1633 (1956).
15. M. Halwer, G.C. Nutting, B.A. Brice, J. Amer. Chem. Soc., **73**, 2786 (1951).
16. J.T. Edsall, H. Edelhoch, R. Lontie, P.R. Morrison, J. Amer. Chem. Soc., **72**, 4641 (1950).
17. H.A. Petersen, J.F. Foster, J. biol. Chem., **240**, 3858 (1965).
18. L.O. Andersson, Biochim. Biophys. Acta, **117**, 115 (1966).
19. C.B. Anfinsen, Comp. rend. trav. Lab. Carlsberg, Ser. chim., **30**, 13 (1956).
20. G. Kalnitsky, J.P. Hummel, C. Dierks, J. biol. Chem., **234**, 1512 (1959).
21. Y. Ohta, J. biol. Chem., **242**, 509 (1967).
22. S. Comoroşan, S. Solomon, S. Vieru, M. Stănescu, St. cerc. biochim., **9**, 147 (1966).
23. Y. Ohta, Y. Ogura, A. Wada, J. biol. Chem., **231**, 5919 (1966).
24. G. Kalnitsky, E.E. Anderson, Biochim. Biophys. Acta, **16**, 302 (1955).
25. F.M. Richards, P.J. Vithayathil, Brookhaven Symposia in Biology, **13**, 115 (1960).
26. Y.V. Wu, J.E. Cluskey, K.R. Sexon, Biochim. Biophys Acta, **133**, 83 (1967).
27. J. Luetscher, J. Amer. Chem. Soc., **61**, 2888 (1939).
28. K. Aoky, J.F. Foster, J. Amer. Chem. Soc., **79**, 3393 (1957).
29. F. Karush, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 5519 (1956).

30. E. Macovschi, St. cerc. biochim., **6**, 467 (1963).
31. W.B. Hardy, J. Physiol., **24**, 158 (1899).
32. S. Arrhenius, *Immuno-chemistry*, MacMillan, New York, 1907.
33. J. Steinhardt, E.M. Zaiser, Advances in protein chemistry, **10**, 156 (1955).
34. M. Kunitz, J.H. Northrop, J. gen. Physiol., **17**, 591 (1934).
35. A.E. Mirsky, M.L. Anson, J. gen. Physiol., **18**, 307 (1935).
36. H. Neurath, J.P. Greenstein, F.W. Putnam, J.O. Erickson, Chem. Revs., **34**, 157 (1944).
37. L. Segal, Acta biol. med. germ., **10**, 488 (1963).
38. M. Kerekes, St. cerc. biochim., **6**, 251 (1963).
39. A. Kovács, M. Kerekes, Z. Inn. Med., **4**, 187 (1961).
40. J.H. Swinehart, G.P. Hess, Biochim. Biophys. Acta, **104**, 205 (1965).
41. A.N. Glazer, H.A. McKenzie, Biochim. Biophys. Acta, **65**, 526 (1962).
42. P. Furda, A. Kovács, M. Kerekes, A. III-a Conf. Rep. de Chimie, Rezumatele lucrărilor, Timişoara, 1966, p. 317.
43. M. Kerekes, St. cerc. biochim., **7**, 205 (1964).
44. M. Kerekes, Naturwiss., **50**, 573 (1963).
45. St. Csögör, M. Kerekes, Naturwiss., **52**, 540 (1965).
46. P.D. Boyer, J. biol. Chem., **158**, 715 (1945).
47. M. Kerekes, St. cerc. biochim., **6**, 245 (1963).
48. M. Kerekes, P. Furda, St. cerc. biochim., **8**, 199 (1965).
49. J. Clément-Métral, J. Garnier, J. Yon, II. Internat. Biophysics Congress, 1966, Abstracts, 102.
50. E. Mihályi, Biochim. Biophys. Acta, **102**, 487 (1965).
51. H.A. Scheraga, *Protein structure*, Academic Press, New York—London, 1961, p. 82.
52. J.T. Yang, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., **79**, 761 (1958).
53. P. Elödi, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 218 (1961).
54. J.G. Foss, Biochim. Biophys. Acta, **47**, 569 (1961).
55. C. Huggins, D. Tapley, E. Jensen, Nature, **167**, 592 (1951).
56. V. Hospelhorn, B. Cross, E.V. Jensen, J. Amer. Chem. Soc., **76**, 2827 (1954).
57. R. Jaenicke, II. Int. Biophysics Congress, 1966, Abstracts, 106.
58. W. Kauzmann, R. B. Simpson, J. Amer. Chem. Soc., **75**, 5154 (1953).
59. M. Dupont, Biochim. Biophys. Acta, **102**, 500 (1965).
60. M. Kerekes, Teză de disertaţie, Acad. R.S.R., Bucureşti, 1964.
61. R.K. Brown, R. Delaney, L. Levine, H. van Vunakis, J. biol. Chem., **234**, 2043 (1959).
62. H. Neurath, G.R. Cooper, J.O. Erickson, J. biol. Chem., **142**, 249 (1942).
63. F.H. White, jr., J. biol. Chem., **235**, 383 (1960).
64. C.C. Yang, Biochim. Biophys. Acta, **133**, 346 (1967).
65. S. Fuchs, F. de Lorenzo, Ch. B. Anfinsen, J. biol. Chem., **242**, 398 (1967).
66. K. Linderstrom-Lang, J.A. Schellmann, în P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, *The enzymes*, Academic Press, New York, vol. I, 1960, p. 443.
67. F.B. Straub, G. Szabolcsi, *Molekularnaia biologhia*, Izdat. „Nauka", Moscova, 1964.

ADVANCES IN ENZYME REGULATION, Vol. 4, *Proceedings of the fourth symposium on Regulation of enzyme activity and synthesis in normal and neoplastic tissues, held in Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, October 4 and 5*, 1965, sub red. George Weber, Editor tehnic Catherine E. Forrest Weber; Symposium Publication Division, Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig, 1966, 381 pagini (Lucrările celui de-al 4-lea simpozion de reglare a activității și sintezei enzimatice la țesuturile normale și neoplazice).

Începînd din anul 1963, s-a luat inițiativa publicării anuale a referatelor ținute în cadrul unui simpozion special organizat la Universitatea din Indianapolis (S.U.A.) referitor la mecanismele de reglare a activității și sintezei enzimatice la țesuturile normale și neoplazice.

Datorită calității deosebite a referatelor, care înglobează rezultate originale completate cu acelea ale altor cercetători, toate volumele apărute anterior s-au bucurat de o primire foarte călduroasă. Aceasta se datorește, printre altele, și faptului că referatele prezentate abordează probleme dintre cele mai actuale ale biochimiei contemporane, acoperind în același timp, prin diversitatea lor, un front larg.

Cel de-al 4-lea volum din această serie de publicații păstrează linia în care au fost tratate și cele anterioare, atît prin valoarea autorilor (de unde ținuta științifică ridicată a referatelor), cît și prin temele abordate.

Volumul de față (381 pagini) cuprinde IX capitole, fiecare dintre ele constituit din două, uneori trei referate, cu numeroase scheme metabolice, grafice și tabele care ilustrează rezultatele obținute. Remarcăm bogata bibliografie care însoțește fiecare referat.

Primul capitol, intitulat *Reglarea metabolismului lipidic de către enzime*, este format din două referate : *Reglarea sintezei acizilor grași în țesutul adipos* de E.G. Ball și *Biosinteza acizilor grași și funcția RNA în post, îmbătrînire și diabet* de A. Gellhorn și W. Benjamin. În cel dintîi (15 pag., 26 indicații bibliografice, 6 figuri) se arată una dintre principalele căi de control al sintezei acizilor grași, și anume capacitatea țesutului adipos de a reoxida coenzimele reduse în timpul proceselor de transformare a glucozei pînă la acetil – CoA. Se discută faptul că țesutul adipos este bogat în enzime de degradare a acizilor malic și izocitric. În cel de-al doilea referat (22 pag., 34 indicații bibliografice, 11 figuri) se arată diferențele constatate între martori și animalele ținute în inaniție, în funcție de vîrstă și la acelea cu diabet aloxanic, în ceea ce privește încorporarea acetatului, sinteza acizilor grași, transportul de glucoză etc.

Cel de-al doilea capitol *„Acțiunea hormonilor asupra biosintezei enzimelor"*, are tot două referate : *Reglarea nivelului FAD-ului hepatic de către hormonii tiroidieni* de R.S. Rivlin și R.G. Langdon, și *Comportarea sincronică a enzimelor glicolitice cheie : glucokinaza, fosfofructokinaza și piruvat kinaza* de G. Weber, R.L. Singhal, N.B. Stamm, M.A. Lea și L. A. Fisher. În primul referat (13 pag., 33 indicații bibliografice, 9 figuri) se demonstrează că în absența hormonului tiroidian concentrația FAD-ului hepatic este redusă, datorită scăderii activității flavokinazei. Cel de-al doilea referat (22 pag., 40 indicații bibliografice, 10 figuri) se ocupă de mecanismul de reglare a metabolismului glucidic și de influența hormonului glucocorticoid și a insulinei asupra acestui mecanism.

Al treilea capitol, *Reglarea enzimelor în cancer*, cuprinde trei referate : *Formarea aerobă a acetatului în celulele tumorale : mecanism și importanță posibilă* de D. Hepp, Prüsse, H. Weiss, O. Wieland, apoi *Compararea activităților enzimelor glicolitice într-o serie de hepatoame* de G. E. Boxer și C.E. Shonk, și *Conceptul corelării moleculare a neoplaziei* de G. Weber și M.A. Lea,

În primul referat (16 pag., 30 indicaţii bibliografice, 13 figuri, 4 tabele) se arată rezultatele obţinute cu două carcinoame, un sarcom şi un hepatom, în ceea ce priveşte acumularea de acid acetic liber. Se face presupunerea că acetatul se acumulează în urma unui proces specific acestor ţesuturi maligne şi se pare că aceasta se datoreşte unei deficienţe în activitatea acetilat tiokinazei. Cel de al doilea referat (7 pag., 9 indicaţii bibliografice, 1 figură, 3 tabele) se referă la variaţia activităţilor enzimelor glicolitice în diferite hepatoame. Ultimul referat al acestui capitol (30 pag., 64 indicaţii bibliografice, 11 figuri, 5 tabele) este o detaliată punere la punct în care sînt introduse şi lucrări proprii asupra metabolismelor intermediare şi spectrul enzimologic din diverse tumori hepatice.

Inducerea de către vitamine, hormoni şi substanţe medicamentoase a enzimelor este subiectul celui de-al patrulea capitol, format din 3 referate : *Factorii care influenţează hidroxilazele steroidice în microzomii hepatici*, şi anume după tratamentul cu diferite insecticide (11 pag., 19 indicaţii bibliografice, 3 figuri, 9 tabele), de R. Kuntzman, R. Welch şi A.H. Conney; *Reglarea biosintezei sterolilor şi steroizilor în placentă* (17 pag., 38 indicaţii bibliografice, 3 figuri, 8 tabele) de C.A. Villee, H.V. Leusden şi L. Zelewski, în care se descriu rezultatele obţinute prin incubări cu acetat şi mevalonat marcat, şi *Studii asupra modului de acţiune al vitaminei* K (15 pag., 28 indicaţii bibliografice, 12 figuri) de R.E. Olson, unde acest mod de acţiune este urmărit pe animale cu deficienţă vitaminică provocată fie printr-o dietă lipsită de vitamina K, fie printr-un adaos de dicumarol, studiindu-se modificările la nivel enzimatic, permeabilitatea celulară, sinteza enzimelor şi a proteinelor cu importanţă biologică.

Capitolul al cincilea, *Reglarea metabolică prin activare, saturare şi feedback*, este format din trei referate : *Studii asupra mecanismului de represiune a carbohidraţilor în ficatul de şobolan* (18 pag., 35 indicaţii bibliografice, 13 figuri) de C. Peraino, C. Lamar şi C.H. Pitot tratează despre rolul membranelor lipoproteice intracelulare care, prin asociere cu unele enzime, ar forma sisteme active complexe ; în *Efectele glucagonului şi ale acizilor graşi cu lanţ lung asupra producţiei de glucoză de către ficatul izolat de şobolan, perfuzat* (5 pag., 22 indicaţii bibliografice, 3 figuri) de E. Struck, J. Ashmore şi O. Wieland sînt redate rezultatele cercetărilor de perfuzie cu lactat a ficatului ; în *Factori nehormonali în controlul gluconeogenezei* (10 pag., 22 indicaţii bibliografice, 4 figuri) de M.G. Herrera, D. Kamm, N. Ruderman şi G. F. Cahill, Jr. se studiază variaţia concentraţiei de alanină în urma perfuziei cu glucoză a ficatului.

În cel de-al şaselea capitol : *Mecanismele de adaptare la nivel enzimatic*" format din două referate : în *Enzime adaptative formate în cursul hiperlipogenezei* (8 pag., 4 figuri, 42 indicaţii bibliografice) de D.M. Gibson, S.E. Hicks şi D.W. Allman se tratează despre creşterea activităţii enzimelor care participă la sinteză şi degradarea acizilor graşi ; *Nivelul enzimatic în şobolanii adaptaţi la foame de 36 ore* (19 pag., 19 indicaţii bibliografice, 15 figuri) de V.R. Potter, R.A. Gebert şi C.H. Pitot comentează creşterea unei serii de enzime din metabolismul glucidic.

Comportarea enzimelor in vitro constituie subiectul celui de-al şaptelea capitol, format din referatul *Efectul progesteronei asupra activităţii enzimatice a suprarenalei în culturi de organe* de D.B. Villee. În acest referat (11 pag., 14 indicaţii bibliografice, 2 figuri, 7 tabele) sînt date exemple de control al activităţilor enzimatice produse de către substrate variate.

Capitolul opt, *Reglarea şi izoenzimele*, este format din trei referate : *Reglarea activităţii triptofan-pirolazei de către triptofan* de W.E. Knox ; *Izoenzimele aspartat-aminotransferazei în ţesuturi şi sînge uman* de O. Bodansky, M.K. Schwarz şi J.S. Nisselbaum, şi *Reglarea ciclului ureic şi ciclul TCA de către amoniac* de N. Katunuma, M. Okada şi Y. Nishii. În aceste trei referate se aduc interesante date referitoare la rolul de reglare al izoenzimelor şi la controlul activităţii lor enzimatice.

Ultimul capitol, al nouălea, format dintr-un singur referat, *Reglarea şi eliberarea de corpi cetonici de către ficat* de H.A. Krebs, este o punere la punct care precizează o serie de aspecte interesante legate de diferitele procese metabolice prin care se formează corpii cetonici.

Ca o concluzie generală care se desprinde după lectura acestui volum, se poate afirma că el va fi de un real ajutor tuturor cercetătorilor care studiază problemele tratate în referatele prezentate.

Dinu Tănăsescu
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România,
București

World review of nutrition and dietetics, sub red. Geoffrey H. Bourne, Atlanta, S.U.A. ; S. Karger, Basel-New York, 1967, vol. 7, 255 pag. cu 10 grafice și 33 tabele.

Importanța ce revine alimentației pentru sănătatea populației a determinat editarea unor sinteze care să reflecte progresele obținute în ultimii ani și problemele majore care se pun în acest domeniu. În 1959 a apărut primul volum din seria *World review of nutrition and dietetics*, iar de curînd a apărut volumul 7.

Valoarea științifică și practică a sintezelor publicate în primele volume explică pe deplin interesul cu care a fost așteptat și primit acesta din urmă. Problemele discutate în volumul 7 completează organic materialele volumelor anterioare, lărgind sfera tematicii din domeniul nutriției.

Un interes deosebit prezintă materialul expus de L. Cesal, L. Blaeslee și E.O. Heady de la Universitatea din Iowa, cu privire la resursele alimentare pe plan mondial. Luînd ca bază consumul alimentar pe anul 1958, se apreciază necesarul alimentar, pentru diferite zone ale lumii, pe anii 1975 și 2000. Nevoile alimentare ale populației se apreciază în ipoteza unei creșteri moderate a populației (169% pînă în anul 2000) sau a unei creșteri importante (239%). Pe baza acestor aprecieri se evidențiază problemele majore care urmează a fi rezolvate pentru satisfacerea nevoilor alimentare ale populației.

Într-un material mai scurt, S.E. Johnson trece în revistă implicațiile economice ale acordării ajutorului alimentar țărilor care nu-și pot acoperi aceste nevoi, insistîndu-se asupra necesității de a se dezvolta resursele alimentare naționale.

Situația alimentației din Tanzania este prezentată într-un material amplu (M.C. Latham și F.J. Stare) care cuprinde date cu privire la structura rației alimentare, la starea de nutriție și la repercusiunile deficiențelor alimentare asupra stării de sănătate a populației : disnutriția proteino-calorică, anemia, gușa endemică, fluoroza, carențe vitaminice etc.

Problema relației dintre alimentație și caria dentară este tratată într-o sinteză amplă, prezentată de L.M. Dalderup de la Institutul de nutriție din Olanda, ca și într-o altă sinteză datorită lui Jenkins G. Neil (Anglia). În primul material, după ce se trec în revistă studiile epidemiologice privind cariile dentare, se analizează rolul glucidelor, proteinelor, lipidelor, sărurilor minerale (Ca, P, Mg), microelementelor (Fl, Sn, Mo, V, Se, Cd), precum și al unor vitamine (A, D, C, B_6) în determinarea cariilor dentare. Se analizează de asemenea rolul structurii alimentelor și al regimului alimentar în etiologia cariei dentare.

În al doilea material, pe baza unei ample bibliografii se analizează rolul fluorului în alimentație, metabolismul acestui microelement, precum și problemele legate de folosirea fluorului în profilaxia cariei dentare.

Într-un material prezentat de A.B. Morrison și Narayana Rao (Canada) se analizează relațiile dintre aportul proteic și cel caloric, insistîndu-se asupra efectelor determinate de reducerea aportului caloric asupra utilizării azotului și compoziției țesuturilor.

În fine, ultimul articol aparține lui G.A. Garton (Scoția) și se ocupă de digestia și absorbția lipidelor la rumegătoare. Problema este analizată în raport cu acțiunea microorganismelor din rumen, cu nivelul și particularitățile absorbției și cu efectul acizilor grași absorbiți asupra lipidelor tisulare.

Prin tematica sa amplă, volumul este de un interes evident pentru specialiștii din domeniul nutriției umane și animale, ca și pentru economiști, biochimiști, stomatologi.

Dr. A. Sporn
Institutul de igienă,
București

Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie (Distrofia musculară progresivă, miotonia, miastenia), sub red. Erick Kuhn, ca omagiu lui Wilhelm Erb, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1966, 532 p.

Cu prilejul împlinirii a 125 de ani de la nașterea lui Wilhelm Erb, eminent om de știință, ale cărui cercetări privind problema atrofiei musculare au devenit clasice, s-a organizat la Heidelberg, între 30 noiembrie și 4 decembrie 1965, un simpozion internațional dedicat celor trei categorii de maladii musculare: distrofia musculară progresivă, miotonia și miastenia. Referatele comunicările și discuțiile respective, la care au participat specialiști de renume mondial, au fost înmănunchiate în volumul pe care îl recenzăm și care reflectă astfel atît complexitatea problemelor abordate, cît și rezultatele obținute pînă în prezent.

Cele 66 de lucrări care alcătuiesc volumul de față cuprind cele mai diferite aspecte ale patologiei musculare, cercetările referindu-se la studierea din punct de vedere anatomic, histologic, fiziologic, biochimic, clinic sau terapeutic, a maladiei musculare respective. Cercetarea biochimică în patologia musculară a început să ocupe un loc din ce în ce mai mare și, în acest sens, este semnificativ faptul că un număr de 17 lucrări au un caracter biochimic mai mult sau mai puțin pronunțat. Dintre acestea, vom semnala cîteva din ele care prezintă un interes deosebit.

Astfel, este lucrarea prezentată de prof. dr. J.C. Dreyfus și colab., de la Facultatea de Medicină din Paris, asupra biochimiei și enzimologiei distrofiilor musculare. Cercetarea comportării enzimelor care participă în glicogenoliză, a enzimelor și izoenzimelor serice, a proteinelor specifice miofibrilelor, a ionilor, a metabolismului muscular în general, a condus autorii la obținerea unui tablou pe atît de complex pe cît de interesant, în ceea ce privește alterarea specific biochimică ce apare în cursul distrofiei musculare la anumite nivele.

Pe aceeași linie se înscriu cercetările prezentate de dr. H. Radu și colab. de la Sanatoriul pentru tratamentul miopatiilor de la Vîlcele, privind încorporarea fosforului radioactiv în mușchi, variațiile fosfatazei alcaline și a fosforului anorganic în maladiile musculare de diverse origini.

Lucrarea lui R. Richterich, din Berna, prezintă rezultatele obținute în cercetarea enzimelor citoplasmatice din mușchi, prin care s-a căutat să se obțină o diferențiere între distrofia și atrofia musculară.

În ceea ce privește miotonia, remarcăm lucrarea prof. dr. E. Kuhn de la Universitatea din Heidelberg, care prezintă un tablou complex al modificărilor clinice și biochimice care au loc în organismul miotonic. Este de asemenea interesantă comunicarea colaboratorului său W. Stein, privind datele biochimice obținute în miotonia experimentală produsă cu ajutorul acidului 2,4-diclorfenoxiacetic (2,4—D).

Prof. J.A. Simpson de la Universitatea din Glasgow a comunicat o serie de rezultate obținute în cercetarea miasteniei musculare, cum ar fi comportarea enzimelor serice, a proteinelor serice și ale lichidului cefalorahidian, testul toleranței la glucoză etc.

Importanța biochimiei ca știință care poate aduce o contribuție substanțială la lămurirea mecanismului de producere a maladiei musculare, este subliniată în ultimul capitol al acestei cărți, în care sînt cuprinse cîteva referate de ansamblu. Personalități științifice, ca prof. H.H. Weber, prof. S. Ebashi, prof. W. Hasselbach, prof. M. Klingenberg ș.a. au prezentat materiale referitoare la histochimia mușchiului scheletic, la mitocondriile musculare, la metabolismul furnizor de energie al mușchiului, la proteinele structurale care intervin în interacțiunea dintre actină și miozină, la reglarea contracției și relaxării musculare etc.

Lucrările simpozionului de la Heidelberg prezintă o importanță deosebită pentru toți acei care lucrează în domeniul patologiei musculare. Parcurgerea acestui volum permite atît clinicienilor cît și biochimiștilor alcătuirea unei imagini de ansamblu, foarte utilă, asupra progreselor actuale realizate în acest domeniu. Bibliografia consemnată la sfîrșitul fiecărei lucrări și indicele alfabetic de la sfîrșitul cărții completează informațiile necesare aprofundării problemelor tratate.

Corina Iordache
Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România,
București

MAX WARMBRAND, M.D., D.O., *The encyclopedia of natural health* (Enciclopedie a sănătății pe cale naturală), The Julian Press, Inc. Publishers, New York, 1962.

În această lucrare, de 468 de pagini și cuprinzînd 6 capitole, precum și cîte un index de autori și de subiecte, autorul urmărește combinarea cunoștințelor științifice cu principiul de bază al medicinii curative *„vis medicatrix naturae"*.

Adresîndu-se publicului larg, cartea are meritul că folosește un limbaj ușor de înțeles, fără însă a se îndepărta de faptele științifice pe care le prezintă riguros.

Pornind de la ideea că nutriția oferă organismului starea fiziologică în care acesta se găsește, autorul explică principalele boli majore și minore ale organismului, dînd totodată și indicații pentru prevenirea lor.

În primul capitol, intitulat *O digestie sănătoasă — cheia unei vieți fericite*, autorul prezintă sistemul digestiv, principalele afecțiuni morfofuncționale (inflamații, ulcerații, constipații, colite ulcerative) ale acestuia, precum și factorii anecși care influențează procesul de digestie, ca: starea sistemului nervos, a sistemului respirator și circulator. În încheierea acestui capitol, autorul arată pericolul pe care-l prezintă diferitele medicamente cu acțiune calmantă, care însă nu duc la vindecare; se subliniază de asemenea rolul pe care-l au dieta și un regim de viață normal, pentru restabilirea echilibrului fiziologic al organismului.

În capitolele următoare (2, 3, 4, 5) sînt analizate şi alte boli, ca cele reumatice, ale aparatului respirator, diabetul, bolile de inimă, urmărindu-se de fiecare dată prezentarea bolii, a organelor sau sistemelor afectate, precum şi influenţa nutriţiei şi a altor factori importanţi, ca tensiunea nervoasă, factorii chimici (alcool, medicamente, droguri), asupra dezvoltării acestor boli. În toate aceste capitole, autorul subliniază rolul crescînd ce revine fizioterapiei, în dauna medicaţiei, în ameliorarea şi vindecarea celor mai multe din bolile prezentate, ca urmare a răspîndirii tot mai largi a concepţiei despre organism ca tot unitar. Faptele cunoscute în laborator, în condiţii statice şi sterile, sînt puse în legătură cu individul, sub toate aspectele sale : biologic, fiziologic şi social. Metodele de laborator sînt privite nu ca probe absolute, ci ca auxiliare în stabilirea diagnosticului şi în vindecare.

În capitolul intitulat *Nutriţia ca ghid în alegerea alimentaţiei*, autorul analizează pe rînd fiecare clasă de alimente din punctul de vedere al conţinutului de calorii, vitamine şi substanţe hrănitoare pe care le oferă, ca şi din punctul de vedere al facilităţii digestiei lor de către organism, arătîndu-se care sînt cele mai avantajoase. Sînt prezentate chiar reţete de preparare a alimentelor, care să nu afecteze prea mult calităţile lor nutritive. Cîteva paragrafe sînt consacrate dietei copiilor, viitoarelor mame şi persoanelor cu greutate sub şi peste normal.

În documentare, autorul s-a bazat mai ales pe articole şi statistici apărute în revistele de specialitate : reviste de practică medicală. Lucrarea este cu atît mai interesantă cu cît, pentru exemplificare, se descriu sau se iau declaraţii de la diferiţii bolnavi trataţi după metoda prezentată de autor.

În această *Enciclopedie a sănătăţii pe cale naturală*, autorul susţine ideea că restabilirea echilibrului fiziologic normal este o proprietate naturală a oricărui organism viu şi că medicii pot ajuta această restabilire prin suplimentarea organismului cu cele necesare şi îndepărtarea obstacolelor ce întîrzie însănătoşirea.

Expunerea materialului fiind făcută într-un mod simplu şi clar, lucrarea îşi atinge scopul propus : de a ajuta la îmbogăţirea cunoştinţelor medicale ale maselor largi şi, implicit, de a contribui la îmbunătăţirea sănătăţii lor.

Pentru felul cum este abordată problema digestiei şi a dietei în diferitele boli, lucrarea este interesantă şi pentru cadrele de specialitate.

Olguţa Macovschi

Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie

Revista „Zeitschrift für physiologische Chemie", apărută în 1877 sub îngrijirea lui Hoppe-Seyler, este cea mai veche revistă din domeniul fiziologiei. De la 1 ianuarie 1967, această revistă este publicată în volume anuale, alcătuite din cîte 12 numere. Fiecare număr apare în prima săptămînă a lunii şi cuprinde circa 80 de pagini (însumînd aproximativ 960 de pagini anual). Acest nou mod de publicare face posibilă editarea tuturor lucrărilor acceptate de redacţie în timp de 2—3 luni. În luna decembrie a fiecărui an se publică şi indexul lucrărilor apărute în tot cursul anului respectiv.

Editura Hoppe-Seyler intenţionează să publice în această revistă lucrări experimentale originale din toate domeniile biochimiei descriptive şi dinamice. Un număr important de pagini din revistă va fi rezervat lucrărilor care se referă la izolarea, proprietăţile şi mecanismul de acţiune a enzimelor, coenzimelor şi hormonilor, precum şi lucrărilor care privesc structura şi sinteza proteinelor sau acizilor nucleici. În acest fel, lucrările publicate în revista „Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie" pot oferi cititorului, în mod sistematic, o privire de ansamblu asupra principalelor aspecte cercetate de biochimia modernă.

Primul număr al revistei (vol. 348, 1967) cuprinde articole valoroase referitoare la : enzime (hidrolaze, peptidaze, conjugaţi ai enzimelor), hormoni (testosteron, androsterona şi C_{19}-steroizi), lipide (biosinteză) şi proteine (purificarea hemoglobinei).

În numerele viitoare vor fi prezentate lucrări asupra metabolismului hidraţilor de carbon, acizilor nucleici, substanţelor proteice, precum şi asupra fosforilării oxidative etc.

Prin varietatea şi actualitatea problemelor abordate, revista „Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie" permite biochimiştilor să-şi întregească şi să-şi aducă la zi cunoştinţele de specialitate, atît în domeniul teoretic cît şi în activitatea practică.

Lucia-Doina Popescu
Cercetător stagiar la Institutul
de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România, Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de exemplare, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

1967 NOV 13

LUCRĂRI APĂRUTE IN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R. PORTOCALĂ şi L. POPA, **Acizii ribonucleici celulari şi virali**, 1966, 25×17,50, 375 p., 8 pl., legat, anvelopă, 26 lei.

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 25×17,50, 285 p., 18 pl., legat, anvelopă, 27 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese. Œuvres choisies**, 1965, 25×17,50, 687 p., legat, anvelopă, 44 lei.

* * * **Omagiu acad. prof. RALUCA RIPAN**, 1966, 30,50×21,50, 628 p. + 2 pl., legat, anvelopă, 50 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 10, NR. 4, P. 299 — 388, BUCUREŞTI, NOIEMBRIE 1967

I. P. „Informaţia" — c. 5812

43816

Lei 12.—